

**Design und Synthese neuartiger Grundstrukturen
zur Inhibition von Aspartat-Proteasen
der Familien A1 und A2**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kerstin Linde
aus
Bergisch Gladbach

Marburg 2012

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Wibke E. Diederich

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Frau Prof. Dr. Wibke E. Diederich am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von April 2009 bis Oktober 2011 durchgeführt.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Aspartat-Proteasen.....	1
1.1.1	Klassifizierung der Aspartat-Proteasen.....	1
1.1.2	Strukturelle Eigenschaften der Familien A1 und A2.....	2
1.1.3	Katalytischer Mechanismus der Peptidspaltung.....	5
1.1.4	Inhibitor-Design für Aspartat-Proteasen der Familien A1 und A2.....	7
1.1.4.1	Allgemeines.....	7
1.1.4.2	Übergangszustand-Analoga peptidischer Natur.....	8
1.1.4.3	Bekannte Übergangszustand-Analoga nicht-peptidischer Natur.....	11
1.2	HIV-Protease.....	13
1.2.1	HIV und AIDS.....	13
1.2.2	Struktur und Wirkmechanismus.....	15
1.2.3	Aktuelle Arzneistoffe in der klinischen Praxis.....	16
1.3	Endothiapepsin.....	18
1.4	Fazit und Aufgabenstellung.....	20
2	NEUARTIGE OFFENKETTIGE INHIBITORKLASSEN	22
2.1	Einleitung	22
2.2	Rationales Design der offenkettigen Derivate	26
2.2.1	Docking.....	26
2.2.2	Darstellung der Hydroxylamine.....	31
2.2.3	Darstellung der primären Amine aus Serinol.....	40
2.3	Einstufensynthese zur Herstellung von Aminen aus Alkoholen.....	46
2.4	Rationales Design der zyklischen Harnstoffe.....	52
2.4.1	Docking.....	52
2.4.2	Syntheseplanung und Durchführung	54
2.5	Struktur-Aktivitäts-Bestimmung	56
2.5.1	Einsatz von Detergenzien in fluoreszenzbasierten, kompetitiven Bindungsassays	56
2.5.2	Polymorphismus und dessen Auswirkungen	63
2.5.3	Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen und Diskussion	67
2.5.3.1	Offenkettige, primäre Amine.....	67
2.5.3.2	Zyklische Harnstoffe	69
2.5.3.3	Hydroxylamine	73
2.6	Ausblick	79
2.6.1	Offenkettige, primäre Amine	79
2.6.2	Zyklische Harnstoffe.....	81
2.6.3	Hydroxylamine	83
3	NEUARTIGE PIPERIDIN-BASIERTE INHIBITOREN.....	90
3.1	Rationales Design der Piperidin-Diester.....	90
3.1.1	Docking.....	90
3.1.2	Syntheseplanung und Durchführung	94
3.2	Rationales Design der dreiarmigen Piperidin-Derivate	100

3.2.1	Docking.....	100
3.2.2	Syntheseplanung und Durchführung.....	105
3.3	Struktur-Aktivitäts-Bestimmung	111
3.3.1	Piperidin-Diester	111
3.3.2	Dreiarmlige Piperidin-Derivate.....	118
4	ZUSAMMENFASSUNG	122
5	EXPERIMENTELLER TEIL	125
5.1	Allgemeine Anmerkungen.....	125
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	129
5.3	Experimentelle Daten der synthetisierten Verbindungen	132
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	246
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	250
8	ANHANG	261
8.1	Erklärung	261
8.2	Danksagung	262
8.3	Lebenslauf.....	264

1 EINLEITUNG

1.1 Aspartat-Proteasen

Peptidasen stellen aufgrund ihrer Vielfältigkeit aussichtsreiche Zielenzyme in der Wirkstoffforschung für den Entwurf von Arzneimitteln zur Behandlung diverser Krankheitsbilder dar. Peptidase-Inhibitoren kommen beispielsweise in der therapeutischen Behandlung gegen Krebs, Parasiten-, Pilz- und Virusinfektionen, Immunkrankheiten sowie bei kardiovaskulären und neurodegenerativen Funktionsstörungen zum Einsatz. [1] Im Allgemeinen sind Peptidasen Enzyme, die die Addition eines Wassermoleküls an eine Amidbindung katalysieren und in der Folge dadurch Proteine und Peptide spalten können. Es wird zwischen Endo- und Exopeptidasen unterschieden. Endopeptidasen spalten die Peptidbindungen im Zentrum einer Peptidkette und sind daher hoch substratspezifisch, während Exopeptidasen nur endständige Peptidbindungen der Aminosäuresequenz spalten und damit vergleichsweise unspezifisch agieren. Peptidasen stellen eine der größten und auch verschiedenartigsten Enzymfamilien dar und sind in unterschiedlichsten Prozessen im Organismus involviert. Sie übernehmen wichtige Funktionen in physiologischen aber auch pathologischen Abläufen, wie z. B. in der Regulierung des Zell- und Tumorwachstums, bei der Aktivierung von Hormonen und pharmakologisch aktiven Peptiden aus ihren Vorläuferproteinen sowie in Entzündungsprozessen. Peptidasen werden bezüglich ihres katalytischen Zentrums, welches für die Spaltung der Amidbindung essenziell ist, in fünf Klassen unterteilt: die Serin-, Threonin-, Cystein-, Metallo- und Aspartat-Peptidasen. Eine detaillierte Übersicht der derzeit bekannten Proteasen findet sich in der MEROPS-Datenbank. [2, 3]

1.1.1 Klassifizierung der Aspartat-Proteasen

Zur Klasse der Aspartat-Proteasen werden alle proteolytischen Enzyme gezählt, die zwei hoch konservierte Aspartate im katalytischen Zentrum aufweisen und im sauren Milieu die höchste Aktivität zeigen. Den ersten Arbeiten zu diesem Thema von Neil D. Rawlings folgend, wird die Gruppe der Aspartat-Proteasen in sechs verschiedene sogenannte Clans aufgeteilt. [4] Ein Clan beinhaltet Peptidasen, die von einem identischen evolutionären Ausgangspunkt abstammen. Die Mitglieder eines Clans werden dann aufgrund ihres Verwandtschaftsgrades in Familien unterteilt. Die evolutionäre Verwandtschaft innerhalb einer Familie ergibt sich durch Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur, durch Übereinstimmungen von Sequenzmotiven in der Nähe des

katalytischen Zentrums sowie durch eine Empfindlichkeit gegenüber Vertretern ähnlicher Inhibitor Klassen. Der größte und bedeutendste Clan AA besteht aus acht Familien, wobei den Familien A1, auch als Pepsin-Familie bezeichnet, und A2, die sogenannte Retropepsin-Familie, mit 2.737 bzw. 818 Sequenzeinträgen die größte Bedeutung zukommt (MEROPS, Stand September 2011).

Im Vergleich zu den anderen drei großen Proteaseklassen, den Serin-, Cystein- und Metallo-Proteasen, umfasst die Klasse der Aspartat-Proteasen eine vergleichsweise kleine Anzahl von Enzymen. Aufgrund des katalytischen Mechanismus der Aspartat-Proteasen, der in Abschnitt 1.1.3 noch im Detail erläutert wird, arbeiten diese am besten in einer sauren Umgebung. Diese Tatsache limitiert das natürliche Vorkommen der Aspartat-Proteasen, wohingegen die anderen drei Proteaseklassen ubiquitär vorkommen und damit einen deutlich größeren Wirkungsbereich für sich einnehmen können. Trotz der relativ geringen Anzahl an Aspartat-Proteasen sind diese in vielen wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. [5] Beispiele für Aspartat-Proteasen, die sich als Zielmolekül in der pharmazeutischen Forschung etabliert haben, sind Renin bei Hypertonie [6], Plasmeptine bei Malaria [7], Cathepsin D bei Krebs [8], HIV-Protease bei der Bekämpfung von AIDS [6] und BACE (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme) zur Behandlung von Alzheimer. [9] Darüber hinaus werden die HTLV-1-Protease zur Behandlung der Infektion mit dem humanen T-lymphotropen Virus 1 [10, 11] sowie die XMRV-Protease im Zusammenhang mit der Entstehung von Prostatakrebs und dem chronischen Erschöpfungssyndrom als mögliche Angriffspunkte diskutiert. [12-14] Alle hier genannten Zielenzyme gehören der Familie A1 bzw. A2 der Aspartat-Proteasen an. Dies verdeutlicht die zentrale Bedeutung dieser Enzymfamilien sowohl für die aktuelle Arzneimitteltherapie der genannten Krankheiten als auch für die Entwicklung neuer, potenter Wirkstoffe.

1.1.2 Strukturelle Eigenschaften der Familien A1 und A2

Tang *et al.* gelangen 1972 mit Pepsin die erste vollständige Strukturaufklärung einer Aspartat-Protease. [15] Nahezu alle Mitglieder der Pepsin-Familie (Familie A1) sind Enzyme von Eukaryoten, haben ihr Aktivitätsoptimum bei niedrigen pH-Werten, werden durch Pepstatin inhibiert und bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit durchschnittlich 327 Aminosäuren. [16] Außerdem besitzen sie untereinander große Übereinstimmungen sowohl in der Sekundär- als auch in der Tertiärstruktur und weisen quasi identische katalytische Zentren auf. Generell können die Tertiärstrukturen der pepsinartigen Peptidasen in zwei Domänen aufgeteilt werden, die auch als C- und N-

terminale Domänen bezeichnet werden. [17] Wie in **Abbildung 1** zu sehen ist, erstreckt sich zwischen den beiden Domänen die Substratbindetasche, in deren Zentrum die beiden katalytischen Aspartate lokalisiert sind. Ein weiteres Charakteristikum dieser Familie ist die sogenannte *Flap*, die mit ihren beiden β -Haarnadelschleifen die Bindetasche von oben abdeckt, das Substrat über polare Wechselwirkungen in der Bindetasche fixiert und somit für die Substratspezifität verantwortlich gemacht wird. [18] Tang *et al.* konnten zeigen, dass die C- und N-terminale Domäne zueinander ebenfalls hohe Homologien in der Sekundär- und Tertiärstruktur aufweisen. [19] Diese Homologien lassen vermuten, dass die strukturelle Anordnung während eines evolutionären Prozesses auf einer Genduplikation und anschließender Vereinigung aus einer ursprünglich homodimeren Aspartat-Protease beruhen könnte. [19, 20]

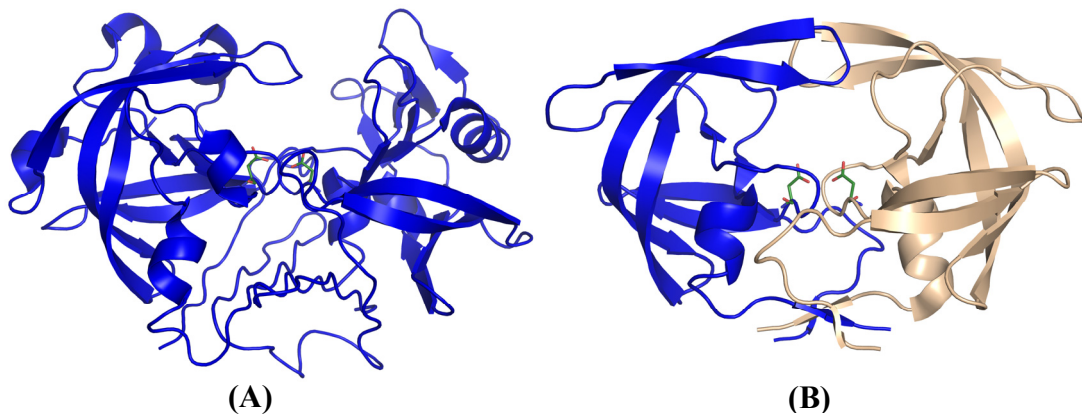


Abbildung 1: (A) 3D-Struktur im Cartoon-Modell von Endothiapepsin, einem Mitglied der Pepsin-Familie (pdb-Code: 2JJI): Es besteht aus einer einzelnen, in blau dargestellten molekularen Kette. (B) 3D-Struktur der HIV-Protease (pdb-Code: 2A4F): Die beiden monomeren Polypeptid-Ketten sind in blau und beige im Cartoon-Modell dargestellt; die katalytischen Aspartate sind in grün hervorgehoben.

Alexander Wlodawer veröffentlichte 1989 mit der HIV-Protease als Erster die Struktur einer solchen homodimeren Aspartat-Protease. Die HIV-Protease setzt sich aus zwei identischen Polypeptidketten mit je 99 Aminosäuren zum aktiven Enzym zusammen, wobei jedes Monomer ein katalytisches Aspartat und eine *Flap* zum Aufbau der Substratbindetasche beisteuert (siehe **Abbildung 1**). [21] Damit sind die retroviralen Proteinasen wesentlich kleiner als die pepsinartigen Vertreter. [22] Diese Grundstruktur wurde in weiteren Retroviren gefunden und damit als das Hauptcharakteristikum der Familie A2 festgelegt. Trotz dieses grundlegenden Unterschieds in der Tertiär- bzw. Quartärstruktur sind große Homologien zur Pepsin-Familie nicht von der Hand zu

weisen. [23] Das konservierte Tyrosin in der *Flap* der pepsinartigen Aspartat-Proteasen wird in der Retropepsin-Familie durch zwei Isoleucine im Beta-Faltblatt der beiden *Flaps* ersetzt. In beiden Fällen ist dieses Strukturelement mit verantwortlich für die Spezifität des Enzyms. Ein Monomer eines Enzyms der Familie A2 ist strukturell eng verwandt mit der C- oder N-terminalen Domäne eines Enzyms der Familie A1. [24] Auch beim Strukturelement des katalytischen Zentrums spiegelt sich die Verwandtschaft wider. Die hoch konservierten katalytischen Aspartat-Reste treten in einem definierten Sequenzmotiv von Aminosäuren auf. Dieses charakteristische Motiv mit Asp-Ser/Thr-Gly ist essenziell für die Ausbildung der katalytischen Konformation und damit ein wichtiger Anhaltspunkt für die Zugehörigkeit zu dieser Peptidase-Klasse. Bei Mitgliedern der Pepsin-Familie liegen üblicherweise zwischen den beiden katalytischen Sequenzmotiven 170 bis 190 Aminosäuren, die für den Aufbau des katalytischen Apparats nötig sind. Bei Vertretern der Retropepsin-Familie befindet sich jeweils ein charakteristisches Sequenzmotiv in einer der beiden identischen Polypeptidketten, und der katalytische Apparat wird erst durch Dimerisierung aktiviert.

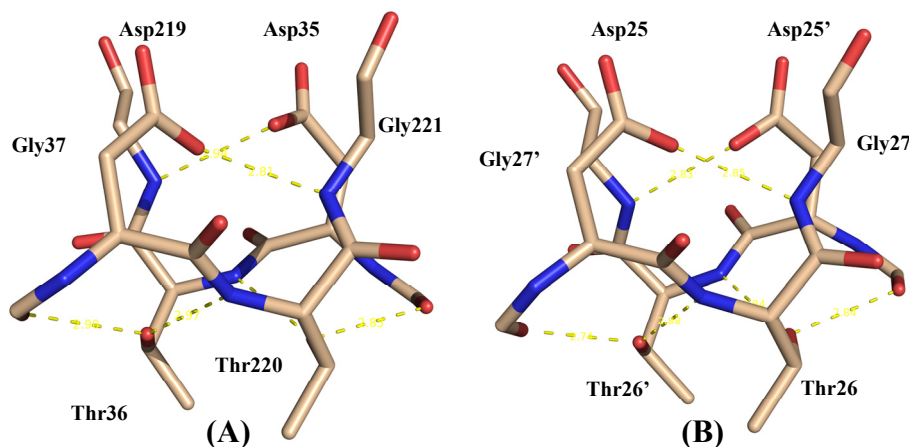


Abbildung 2: Wasserstoffbrückennetzwerk der rigiden, katalytischen Zentren bei (A) Endothiapepsin als ein Beispiel für pepsinartige Aspartat-Proteasen (pdb-Code: 2JJI) und (B) bei der HIV-Protease als einem Vertreter der Retropepsin-Familie (pdb-Code: 2A4F). In beiden Fällen bildet der Aspartat-Rest zum Rückgrat-NH des Glycins, welches um zwei Aminosäuren vorgelagert ist, eine Wasserstoffbrücke aus. Zusätzlich interagiert die Hydroxygruppe des Threonins sowohl mit dem Rückgrat-NH des Threonins als auch mit dem Carbonylsauerstoff der Aminosäure vor dem katalytischen Aspartat der jeweils anderen Domäne; Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Stickstoffatome sind jeweils in beige, blau und rot illustriert.

In beiden Fällen sorgt die Proteinfaltung dafür, dass die beiden katalytischen Aspartate in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden, um das katalytische Zentrum aufzubauen. [17, 20] Die beiden konservierten Motive liegen in einer schleifenartigen Anordnung übereinander und werden durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert. Dadurch entsteht ein hochgradig rigider Komplex, der das katalytische Zentrum ausbildet und oft als „*fireman's grip*“ bezeichnet wird. [25, 26] In **Abbildung 2** ist das beschriebene Netzwerk für ein Enzym der Familie A1 im Vergleich mit einem Vertreter der Familie A2 dargestellt. In beiden Fällen ist der Aufbau dieses Bereiches hoch konserviert und verdeutlicht die enge Verwandtschaft dieser beiden Klassen. [20, 22] Der identische Aufbau der katalytischen Zentren spiegelt sich auch in der identischen Arbeitsweise der Enzyme, die in Abschnitt 1.1.3 genauer erläutert wird, wider. Ein weiteres hoch konserviertes Strukturmerkmal ist die sogenannte ψ -Schleife, die sowohl in der N- als auch in der C-terminalen Domäne jeweils einmal auftritt. Dabei zieht sich durch die weite Schleife, auf der sich das katalytische Sequenzmotiv Asp-Thr-Gly befindet, ein Faden der β -Struktur. Dieser Faden beschreibt eine Aminosäuresequenz mit Leu-Gly-Ile, welche hoch konserviert ist. In dieser Anordnung liegen der Leucin- und der Isoleucin-Rest unter- bzw. oberhalb der Schleife, wodurch das Glycin in seine Position innerhalb der Schleife eingeschlossen wird. [20, 27]

1.1.3 Katalytischer Mechanismus der Peptidspaltung

Im Gegensatz zu Serin- oder Cystein-Proteasen bildet sich während der Spaltung einer Peptidbindung durch Aspartat-Proteasen keine kovalent gebundene Zwischenstufe aus, sondern es entsteht ein nicht kovalent gebundener und neutraler tetraedrischer Übergangszustand, der dann zu den entsprechenden Spaltprodukten, einer Carbonsäure und einem primären Amin, zerfällt. Die beiden katalytischen Aspartate fixieren durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk ein Wassermolekül, welches für die Hydrolyse der Peptidbindung eine entscheidende Rolle übernimmt. Durch die Bindung an die Aspartate wird die Nukleophilie des Wassers erhöht. Das Sauerstoffatom des aktivierten Wassers greift nukleophil an das Carbonylkohlenstoffatom der zu spaltenden Amidbindung des Substrats an. Wie in **Abbildung 3** dargestellt, agiert dabei ein Aspartat als Akzeptor und abstrahiert ein Proton des Wassermoleküls. Das zweite Aspartat fungiert als Donor, was zu einer partial positiven Ladung am Carbonylkohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung führt und dieses so für einen nukleophilen Angriff zugänglich macht. Durch den nukleophilen Angriff des partiell negativ geladenen Sauerstoffatoms des Wassers bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand eines geminalen Diols. [28] Dieser zerfällt unter Rückbildung der

stabilen Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung in die entsprechende Säure und das entsprechende Amin. Aufgrund dieser Funktionsweise wird oft von einer Säure-Base-Katalyse oder von einem „push-pull“-Mechanismus gesprochen. [1, 20, 29]

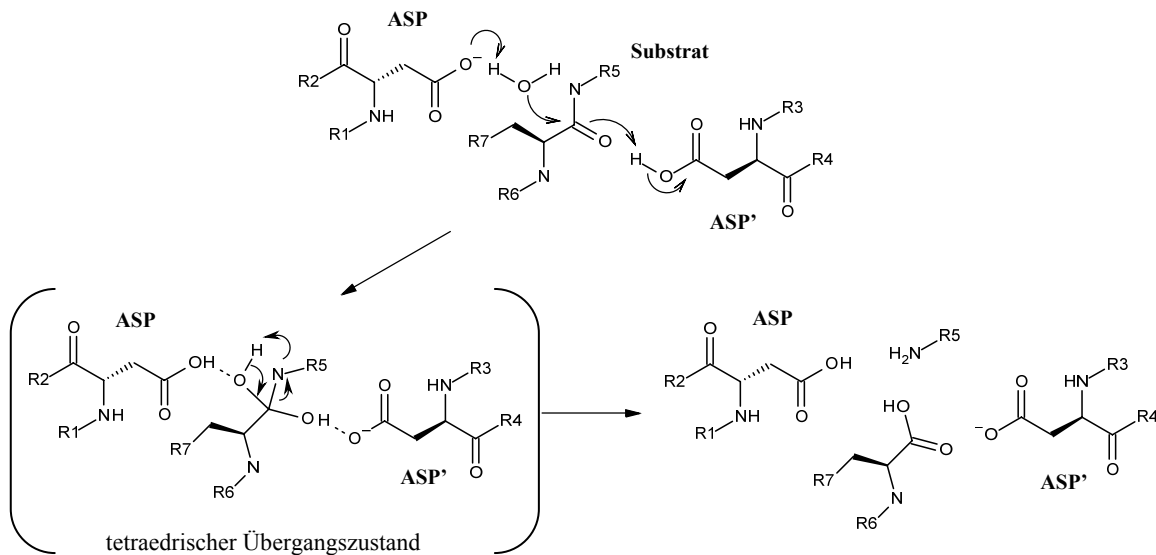


Abbildung 3: Schematische Darstellung der katalytischen Peptidspaltung bei Aspartat-Proteasen. Die beiden Aspartate des katalytischen Zentrums sind mit ASP und ASP' gekennzeichnet. Die Reste R1-R4 stellen Aminosäuren in der weiteren Sequenz des Proteins und die Reste R5-R7 des Peptids dar. [28]

Beiderseits der Spaltstelle des Substrats und in direkter Nachbarschaft zu den katalytischen Aspartaten des Enzyms befinden sich die sogenannten Spezifitätstaschen, die für die selektive Substraterkennung verantwortlich sind. Die Bindetaschen interagieren mit den Seitenkettenresten des Substratmoleküls, wobei auffällig ist, dass die Taschen im Vergleich zu den Serin-Proteasen sowohl nach links als auch nach rechts von der Spaltstelle sehr gut ausgebildet sind. Für die Aspartat-Proteasen ist es wichtig, das Substratmolekül durch ausgeprägte Wechselwirkungen in den Spezifitätstaschen zu erkennen und zu fixieren, da sie keine kovalente Bindung zum Substrat eingehen. Um also einen potenten Inhibitor für Aspartat-Proteasen zu entwickeln, muss versucht werden, die Taschen (S1, S2, S3, S1', S2', S3') beiderseits des katalytischen Zentrums zu besetzen. [30] Darin begründet sich die Beobachtung, dass hoch affine Liganden der Aspartat-Protease meist deutlich höhere Molekulargewichte aufweisen als Inhibitoren anderer Enzymklassen.

1.1.4 Inhibitor-Design für Aspartat-Proteasen der Familien A1 und A2

1.1.4.1 Allgemeines

Alle bislang entwickelten Aspartat-Protease-Inhibitoren binden an ihr Zielenzym ausschließlich über nichtkovalente Interaktionen. Damit handelt es sich um reversible Inhibitoren, die erst effektiv wirken können, wenn sie eine größere Affinität zum Zielenzym aufweisen als das natürliche Substrat. Dieses Ziel lässt sich durch eine möglichst große Anzahl nichtkovalenter Interaktionen des Inhibitors mit dem Targetenzym erreichen. Eine bewährte Methode für die Entwicklung neuer Inhibitoren für Aspartat-Proteasen ist der Eingriff in den katalytischen Spaltungsprozess. Dabei wird versucht, den tetraedrischen Übergangszustand mit substratanalogen Substanzen, die jedoch keine hydrolysierbare Amidbindung besitzen, zu imitieren. [31] Ein weitverbreitetes Strukturelement für diese Art der Enzymhemmung ist das Hydroxymethylcarbonyl- (auch Norstatin-) Isooster, welches mit unterschiedlichen Resten versehen bei einer Vielzahl von Aspartat-Proteasen wie Renin, BACE1, Plasmepsin, HIV-Protease oder HTLV-I Protease als Inhibitor mit nanomolarer Aktivität untersucht worden ist. [32] Die teilweise sehr hohen Affinitäten der Übergangszustand-Mimetika entstehen jedoch nicht nur durch Imitation des Übergangszustands, sondern auch durch die Verdrängung des katalytischen Wassermoleküls, welches für die Hydrolyse des Substrats zwischen den beiden Aspartat-Resten fixiert wird. Damit kommt zu dem enthalpischen Energiegewinn durch die nichtkovalenten Kontakte auch noch ein entropischer Beitrag. [33]

Ein großer Vorteil der Übergangszustand-Mimetika ist deren Selektivität und damit die geringe Aktivität der Inhibitoren gegen Mitglieder anderer Peptidase-Klassen wie beispielsweise den Cystein-Peptidasen. Diese Klassen-Spezifität ist ein erwünschter Effekt in der Wirkstoffentwicklung. Die große Herausforderung bei der Entwicklung von Übergangszustand-Mimetika ist es, sowohl gute pharmakologische Eigenschaften als auch eine hohe Selektivität gegenüber einzelnen Vertretern der Aspartat-Klasse zu erreichen. Diese beiden Anforderungen in einem Molekül zu vereinen, ist ein unabdingbares Kriterium, um einen oral verfügbaren Wirkstoff zu entwerfen. Peptid-Analoga zeigen zwar in der Regel sehr gute Affinitäten zum Enzym und können den tetraedrischen Übergangszustand optimal imitieren, allerdings weisen sie üblicherweise inakzeptable pharmakokinetische Eigenschaften auf. Nichtsdestotrotz konnten einige beachtliche Erfolge auf diesem Gebiet erzielt werden. Die Bedeutung der Übergangszustand-Analoga wird deutlich, wenn man bedenkt, dass alle Wirkstoffe

gegen Aspartat-Proteasen, die sich derzeit in der klinischen Anwendung befinden, auf genau diesem Prinzip beruhen. Als Beispiele können der Renin-Inhibitor Aliskiren und die HIV-Protease-Inhibitoren Saquinavir und Darunavir genannt werden.

Zwischen 1970 und 1980 wurde die Entwicklung von Inhibitoren gegen Renin von der pharmazeutischen Industrie aufgenommen und damit erstmals eine Aspartat-Protease als Zielenzym ausgewählt. Renin spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Dieses System reguliert den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers und wirkt somit in entscheidender Weise auf den Blutdruck ein. Renin spaltet Angiotensinogen selektiv zwischen den Aminosäuren 10-11 in Angiotensin I, welches dann durch das ACE („*Angiotensin-Converting-Enzyme*“) in Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II selbst bewirkt eine allgemeine Vasokonstriktion an Blutgefäßen und zusätzlich die Ausschüttung von Aldosteron, das wiederum eine Retention von Wasser und Natrium induziert. [34, 35] Damit stellt Renin ein wichtiges Zielmolekül für die Behandlung von Bluthochdruck dar. Die meisten der zunächst entwickelten Verbindungen setzten sich aus Teilsequenzen des natürlichen Substrats Angiotensinogen zusammen. Durch Austausch der spaltbaren Amidbindung gegen unterschiedlichste nicht hydrolysierbare Komponenten wurden einige potente Inhibitoren entwickelt, die den tetraedrischen Übergangszustand imitieren. Allerdings können sowohl die peptidartigen Strukturen als auch die Größe der „*first-generation*“-Inhibitoren für die schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Verbindungen verantwortlich gemacht werden. [36, 37]

1.1.4.2 Übergangszustand-Analoga peptidischer Natur

Der überwiegende Teil der bisher entwickelten Aspartat-Protease-Inhibitoren imitiert den tetraedrischen Übergangszustand und führt auf diese Weise zu einer Hemmung des Enzyms. In **Abbildung 4** sind einige Strukturelemente gezeigt, die typischerweise unter Verdrängung des katalytischen Wassermoleküls mit einem sekundären Alkohol oder einem Amin die katalytischen Aspartate adressieren. Zu den Grundstrukturen, die eine Hydroxygruppe als zentrales Element aufweisen, zählen das Statin- bzw. Norstatin-Motiv, die Hydroxyethylen- sowie die Hydroxyethylamin-Gruppe. [6, 33, 38] Die entsprechenden Amin-Analoga werden als Aminostatin, Aminoethylen- bzw. Aminoethylamin-Motiv bezeichnet. [39, 40]

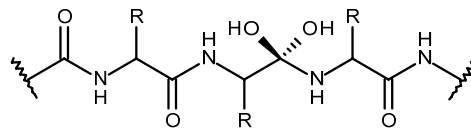
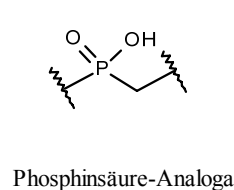
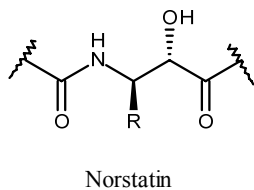
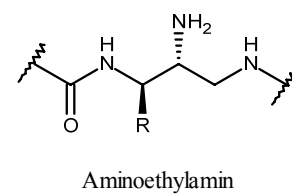
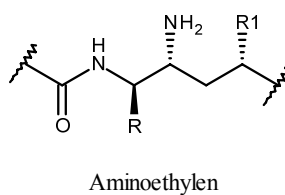
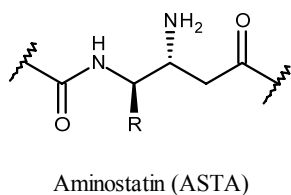
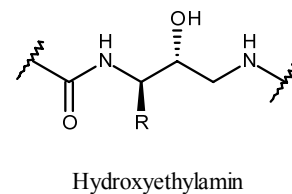
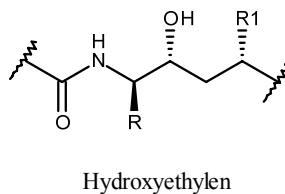
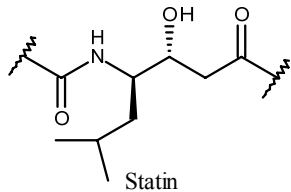
Übergangszustand der Peptidspaltung:Übergangszustand-Mimetika:

Abbildung 4: Strukturmotive der Übergangszustand-Mimetika bei Aspartat-Proteasen.

Das Statin-Derivat Pepstatin wurde Mitte der siebziger Jahre im Labor von Jordan Tang entdeckt und ist der erste Übergangszustand-Inhibitor. Wie sich später herausstellte, enthält Pepstatin das Basisstrukturelement, das für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Aspartat-Proteasen herangezogen wurde. [41]

Pepstatin beschreibt das Hexapeptid Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta-OH, das aus Kulturfiltraten verschiedener Arten der *Actinomyces* isoliert werden konnte. [42] Durch den Einbau der nicht proteinogenen Aminosäure Statin an der Spaltstelle wird das Pepstatin zu einer nicht hydrolysierbaren Verbindung. Auf diese Weise entsteht ein sehr potenter Inhibitor, der gegen nahezu alle Mitglieder der Familien A1 und A2 Affinitäten bis in den subnanomolaren Bereich aufweist. Die schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften von Pepstatin machten einen Einsatz als Wirkstoff zwar unmöglich, das charakteristische Statin-Motiv wurde jedoch systematisch weiterentwickelt. Basierend auf den Arbeiten zur Aspartat-Protease Renin führten diese Bemühungen zu den ersten

klinischen Kandidaten zur Behandlung von AIDS, nämlich als potente Inhibitoren der HIV-Protease mit einem Hydroxyethylamin-Motiv als zentralem Strukturelement. Saquinavir (Markteinführung: 1995) und Indinavir (1996), in **Abbildung 5** dargestellt, waren die ersten zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren. Das Problem der schlechten Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen und die daraus resultierenden hohen einzunehmenden Dosen führten zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen, die in der weiteren Entwicklung von Arzneistoffen zu verbessern sind. [43, 44] Die Entwicklung von neuartigen HIV-Protease-Inhibitoren wird in Abschnitt 1.1.4.3 im Detail betrachtet.

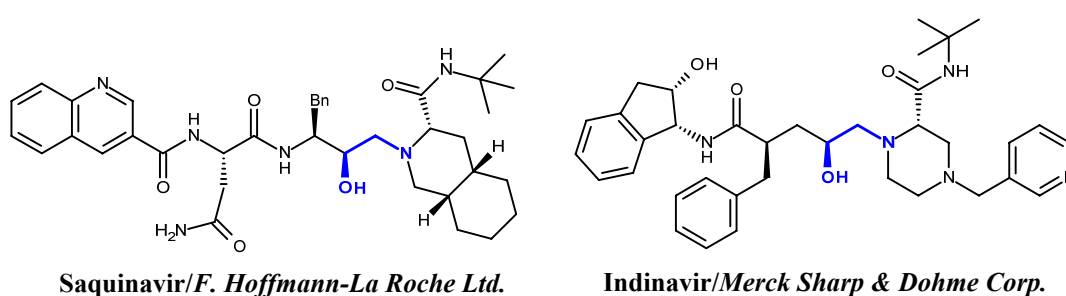


Abbildung 5: Strukturen der ersten zugelassenen HIV-Protease-Inhibitoren Saquinavir und Indinavir. In blau hervorgehoben ist das charakteristische Strukturelement, die Hydroxyethylamin-Gruppe, die den Übergangszustand im katalytischen Prozess imitiert, indem die Hydroxygruppe an die katalytischen Aspartate bindet und dadurch das katalytische Wassermolekül verdrängt.

Das Hydroxyethylamin-Motiv wurde bereits 1987 von Dann *et al.* ebenfalls für die Inhibition von Renin entwickelt und untersucht (**Abbildung 4**). Die Hydroxygruppe des Aminoalkohols bindet dabei, identisch zu den Statin- und den Hydroxyethyl-Analoga, an das katalytische Zentrum. [45] Ein weiteres Motiv dieser Gruppe ist das Hydroxymethylcarbonyl-Isoster (auch Norstatin), welches potente Inhibitoren gegen Renin, HIV-Protease, die Plasmepepsine, β -Sekretase und HTLV-1 Protease lieferte. [32] Aspartat-Inhibitoren, die den Übergangszustand mit einer Phosphinsäuregruppe imitieren, wurden von Bartlett und Mitarbeitern entwickelt. [46] Auch hier konnten potente Verbindungen synthetisiert werden, allerdings wird bei physiologischen pH-Werten die Hydroxygruppe ionisiert und damit für die Bindung an das Enzym inaktiviert. [47]

1.1.4.3 Bekannte Übergangszustand-Analoga nicht-peptidischer Natur

Eine der schwierigsten Aufgaben des heutigen Wirkstoffdesigns ist die Entwicklung von Verbindungen, die nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* effektiv wirken. Eine gute orale Bioverfügbarkeit im Organismus zu erreichen, ist oft die entscheidende Hürde in der Medikamentenentwicklung. Lipinskis sog. „rule of five“ ist die Faustregel zur Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit einer chemischen Verbindung. Sie besagt, dass eine Verringerung des Molekulargewichts auf ca. 500 Da, eine Reduzierung der Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren auf jeweils ca. fünf sowie das Einstellen der Lipophilie auf einen $\log P < 5$ die Bioverfügbarkeit einer Substanz verbessert. [48] Weiter wird angenommen, dass die polare Oberfläche der Substanz sowie die frei drehbaren Bindungen im Molekül mit der Bioverfügbarkeit korrelieren. [49] Da die meisten Peptide oder peptidartigen Verbindungen aus natürlichen Aminosäuren aufgebaut werden und infolgedessen niedrige Bioverfügbarkeiten aufweisen, liegt der Fokus des Wirkstoffdesigns auf der rationalen Modifikation von Peptiden hin zu weniger peptidartigen Leitstrukturen. Diese Bemühungen resultierten in strukturell stark variierenden Grundstrukturen, von denen einige in **Abbildung 6** zusammengefasst sind.

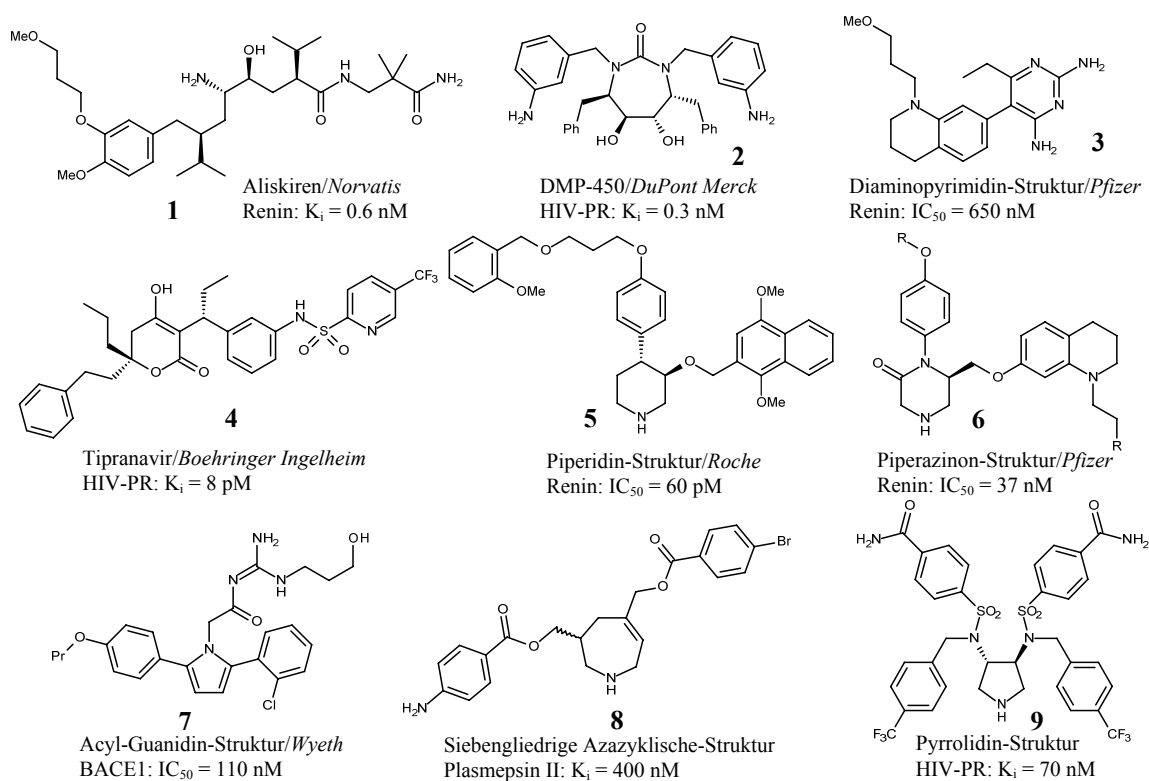


Abbildung 6: Verschiedene Grundstrukturen von nicht-peptidartigen Aspartat-Protease-Inhibitoren.

Ein großer Erfolg dieser Methodik zeigt sich in der Zulassung des Arzneistoffs Aliskiren **1**, dem ersten oralen, direkten Renin-Inhibitor der *Novartis AG* zur Behandlung der Hypertonie durch die FDA im Jahr 2007. Die Bioverfügbarkeit und auch die Selektivität konnte im Vergleich mit den *in vitro* ebenfalls hoch potenten Peptid-Analoga deutlich erhöht werden, obwohl diese Verbindung immer noch das Hydroxyethylenamin als zentrale Einheit zur Adressierung des katalytischen Zentrums aufweist. [50, 51]

Tipranavir **4** ist ein neuartiger HIV-Protease-Inhibitor der *Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG*, der 2005 als erster nicht peptidischer Wirkstoff für die therapeutische Anwendung gegen AIDS zugelassen wurde. Der zentrale heterozyklische Ring leitet sich von Warfarin ab, einem Wirkstoff aus der Klasse der Cumarine, der in einem Hochdurchsatz-Screening (HTS; engl. *High-Throughput-Screening*) als Leitstruktur für die HIV-Protease identifiziert wurde. Auch hier adressiert die Hydroxygruppe das katalytische Zentrum unter Verdrängung des konservierten Wassers und die Carbonylgruppe des Lactons interagiert mit den beiden Isoleucinen (Ile50 und 50') der Flapregion. Diese Interaktion verdrängt zusätzlich das Wassermolekül, das üblicherweise zwischen den beiden Isoleucinen der Flapregion fixiert ist. [52, 53]

DMP-450 **2**, ebenfalls ein HIV-Protease-Inhibitor, besitzt als zentrales Strukturelement ein vicinales Diol, welches an die katalytischen Aspartate bindet. Gleichzeitig adressiert die Carbonylgruppe des Harnstoffs direkt die Isoleucine der Flapregion unter Verdrängung eines konservierten Wassermoleküls. Die zyklischen Harnstoffe sind ebenfalls hoch potente Inhibitoren mit einer Affinität im subnanomolaren Bereich. [54, 55] DMP-450 **2** sollte unter dem Namen Mozenavir in die Therapie eingeführt werden. In der Anwendung haben sich aber keine besonderen Vorteile gegenüber herkömmlichen Proteasehemmern gezeigt, weshalb das Projekt von der *DuPont Merck Pharmaceutical Company* nicht weiter verfolgt wurde.

Die Piperidin-Derivate **5** der *F. Hoffmann-La Roche Ltd.* mit ihrem heterozyklischen Grundgerüst wurden in einem HTS als potenzielle Inhibitoren gegen Renin identifiziert. Das Stickstoffatom des Sechsrings adressiert in diesen Molekülen das katalytische Zentrum der Aspartat-Protease Renin und imitiert so den tetraedrischen Übergangszustand. Ungewöhnlich ist die geöffnete *Flap*, auch während der Inhibitor an das Enzym gebunden ist (siehe auch Kapitel 3.1). [56-58]

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde in den Laboratorien der *Pfizer Inc.* mit den strukturell ähnlichen Piperazinonen **6** eine weitere Grundstruktur geschaffen, die IC₅₀-

Werte in subnanomolaren Bereichen aufweist. [59, 60] Das Diaminopyrimidin-Grundgerüst **3** wurde ebenfalls von der *Pfizer Inc.* im HTS identifiziert und anschließend optimiert. [61]

Ein weiteres interessantes Strukturelement zur Adressierung des katalytischen Zentrums ist das Acyl-Guanidin **7**. Es wurde von der *Wyeth Corp.* als sehr affiner Inhibitor gegen BACE1 entdeckt und weiterentwickelt. In diesem Fall interagiert der unter physiologischen Bedingungen protonierte Acyl-Guanidin Rest über ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit dem katalytischen Zentrum. [62]

Sowohl der stickstoffhaltige Siebenring **8** als auch die Pyrrolidin-Grundstruktur **9** wurden im Arbeitskreis Diederich, Philipps-Universität Marburg, entwickelt und zeigen Affinitäten bis in den nanomolaren Bereich hinein. In beiden Fällen adressiert das Stickstoffatom des Rings die katalytischen Aspartate, wobei der Siebenring **8** als potenter Inhibitor gegen Plasmapsin II und das Pyrrolidin **9** gegen die HIV-Protease entwickelt wurde. [63-65]

Die hier vorgestellten Strukturelemente fungieren auf verschiedenste Weisen als Übergangszustand-Mimetika. Unterschiedlichste Übersichtsartikel haben sich mit der Entwicklung nicht-peptidartiger Peptidase-Inhibitoren beschäftigt. [1, 33, 38, 66, 67] Die Bemühungen der vergangenen 15 Jahre, einen nicht peptidischen Wirkstoff als Asparat-Protease-Inhibitoren zu entwickeln, haben sich im therapeutischen und wirtschaftlichen Erfolg von Aliskiren **1** und Tipranavir **4** gerechtfertigt. Dies motiviert die Forschung nach weiteren neuartigen Substanzklassen, die optimalerweise noch bessere pharmakologische Eigenschaften aufweisen sollten.

1.2 HIV-Protease

1.2.1 HIV und AIDS

Nach den aktuell verfügbaren Daten, die das Jahr 2009 betreffen, beziffert die Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organization*) die Zahl der mit HIV infizierten Menschen weltweit auf 33,3 Millionen. 2,9 Millionen Neuinfektionen und eine Mortalität von 1,8 Millionen Menschen im Jahr 2009 veranschaulichen die anhaltende Ernsthaftigkeit dieser Krankheit. [68]

Der HI-Virus gehört zur Klasse der Retroviren und führt nach einer mehrjährigen Inkubationszeit zu AIDS, einer bis heute immer noch unheilbaren Immunschwächekrankheit. Die HIV-Protease spielt eine essenzielle Rolle im viralen

Lebenszyklus des HI-Virus. Der Lebenszyklus eines Retrovirus kann in mehrere Abschnitte unterteilt werden und ist in **Abbildung 7** schematisch dargestellt. [69]

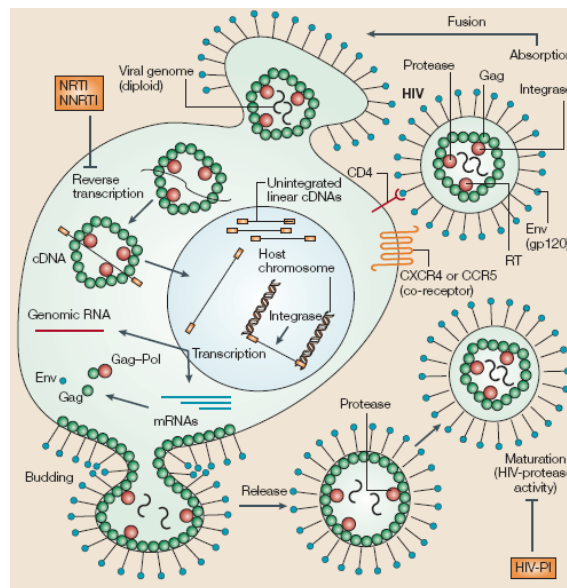


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Lebenszyklus des HI-Virus. [69]

Die Vermehrung des Virus beginnt mit dessen Fusion mit der Membran der Wirtszelle durch Andocken an die CD4-Rezeptoren und nachfolgendem Eintritt in die Zelle. Im nächsten Schritt erfolgt die reverse Transkription der viralen RNA mit Hilfe der viruseigenen Reversen Transkriptase (RT). Anschließend wird die Integration der proviralen DNA in das Genom der Wirtszelle durch die HIV-Integrase (IN) katalysiert. Unter Verwendung der Transkriptions- und Translations-Maschinerie der Wirtszelle werden sowohl die genomische RNA, das Gag, das Gag-Pol als auch die Env-Polypeptide produziert. Die virale RNA wandert mit den Polyprotein-Vorläufern Gag und Gag-Pol zur Zellmembran, die nun durch Ausschleusung und Knospung, dem sogenannten „budding“, zu neuen Virus-Partikeln geformt werden. Das infektiöse Virus entsteht erst, nachdem die HIV-Protease (PR) die Vorläufer-Proteine in aktive Proteine gespalten hat. Das detaillierte Verständnis des Lebenszyklus des HI-Virus verdeutlicht die potenziellen Angriffspunkte, die die Ausbreitung und Vermehrung der Viren verhindern können. Die derzeitigen Zielenzyme für die therapeutische Behandlung von AIDS sind die virale RT, IN, PR sowie die Enzyme, die für den Eintritt in die Wirtszelle verantwortlich sind.

1.2.2 Struktur und Wirkmechanismus

Die allgemeine Struktur einer Protease der Familie A2 wurde bereits im Abschnitt 1.1.2 behandelt. Hier soll die HIV-Protease im Hinblick auf ihre Wirkungsweise als molekulares Target im Detail betrachtet und analysiert werden. Die HIV-Protease ist ein Homodimer und wird aus zwei identischen Polypeptidketten mit jeweils 99 Aminosäuren aufgebaut. Das katalytische Zentrum setzt sich, wie bei den Mitgliedern dieser Familie typisch, aus dem charakteristischen Sequenzmotiv von Asp25-Thr26-Gly27 zusammen. Die retrovirale Protease zeigt zusätzlich ein konserviertes Motiv der Sequenz Gly-Asp-Asp nahe der C-Termini sowie die glycinreichen Schleifen in der Mitte des Proteins, die sogenannten *Flaps*. Die *Flaps* bestehen aus zwei antiparallelen β -Strängen, die an ihren Enden interagieren. Sie spielen bei der Bindung und Fixierung des Substrats eine entscheidende Rolle. Über ein Wassermolekül („*Flap-Wasser*“) wird die Wechselwirkung zwischen zwei Carbonylgruppen des Substrats mit den Hauptketten-NHs der Isoleucine 50 und 50' vermittelt und somit die *Flaps* in einer geschlossenen Konformation fixiert. Die beiden C- und N-Termini interagieren in Form eines viersträngigen β -Faltblatts und bilden so den größten Teil der dimeren Kontaktfläche aus. Die Bindetasche erstreckt sich zwischen den beiden identischen Untereinheiten als längliche Kluft, in deren Zentrum die katalytischen Aspartate zum liegen kommen.

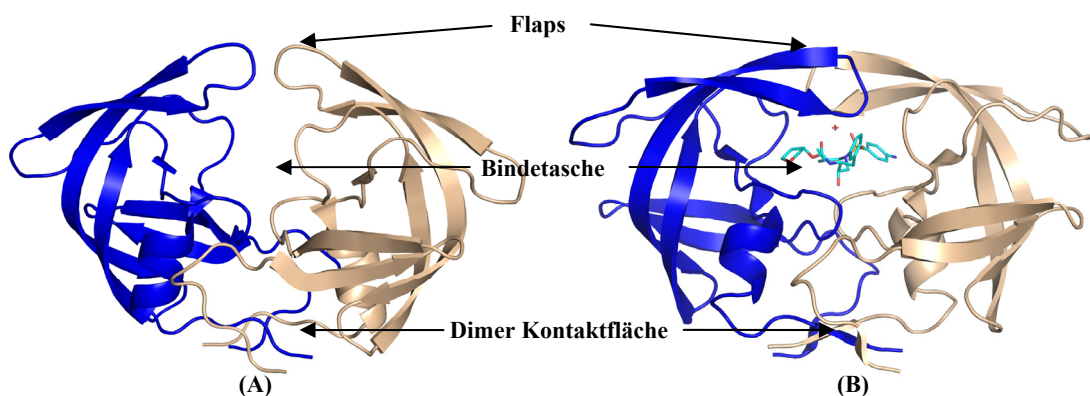


Abbildung 8: Struktur der HIV-Protease. (A) Die HIV-Protease ohne Ligand gebunden in der offenen Flap-Konformation (pdb-Code:2PCO). (B) Die HIV-Protease mit Amprenavir in der Bindetasche gebunden mit der geschlossenen Flap (pdb-Code:3EKV); roter Stern kennzeichnet das „Flap-Wasser“.

Zur Verdeutlichung sind in **Abbildung 8** Strukturen der HIV-Protease sowohl im nativen Zustand als auch mit gebundenem Inhibitor abgebildet. Die Subtaschen, die für

die Bindung der Seitenketten des Substrats verantwortlich sind, werden hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut. Aufgrund der Symmetrie des Enzyms sind die Subtaschen S1/S1', S2/S2', etc. untereinander identisch. Wie in **Abbildung 9** zu erkennen, wird die S1-Tasche ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut und bindet somit bevorzugt hydrophobe Reste des Substrats. Die S2-Tasche toleriert ein weites Spektrum von Substratresten, da sie mit Asp29 und Asp30 zwei Aminosäuren enthält, die die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Substrat ermöglichen. Die Aminosäuren Leu23 und Arg8 bilden die S3-Tasche aus, wobei eine strikte Trennung zur S1-Tasche nicht möglich ist. Aus diesem Grund wird diese oft als Teil der S1-Tasche betrachtet.

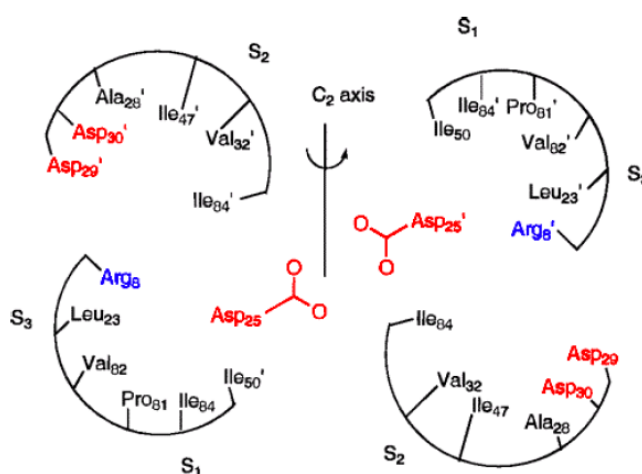


Abbildung 9: Schematische Darstellung der an die Bindetasche grenzenden Aminosäuren. [70]

1.2.3 Aktuelle Arzneistoffe in der klinischen Praxis

Aktuell sind neun HIV-Protease-Inhibitoren zur Behandlung von AIDS zugelassen. Alle sind kompetitive Binder der HIV-Protease und, Tipranavir **4** ausgenommen, mit einer identischen Grundstruktur, dem Hydroxyethylamin-Motiv, und damit mit einem ähnlichen Bindungsmodus, ausgestattet. In **Abbildung 10** ist der Bindungsmodus von Saquinavir **10** als Vertreter der peptidartigen Inhibitoren und von Tipranavir **4**, einem nicht peptidartigen Vertreter, im Vergleich dargestellt.

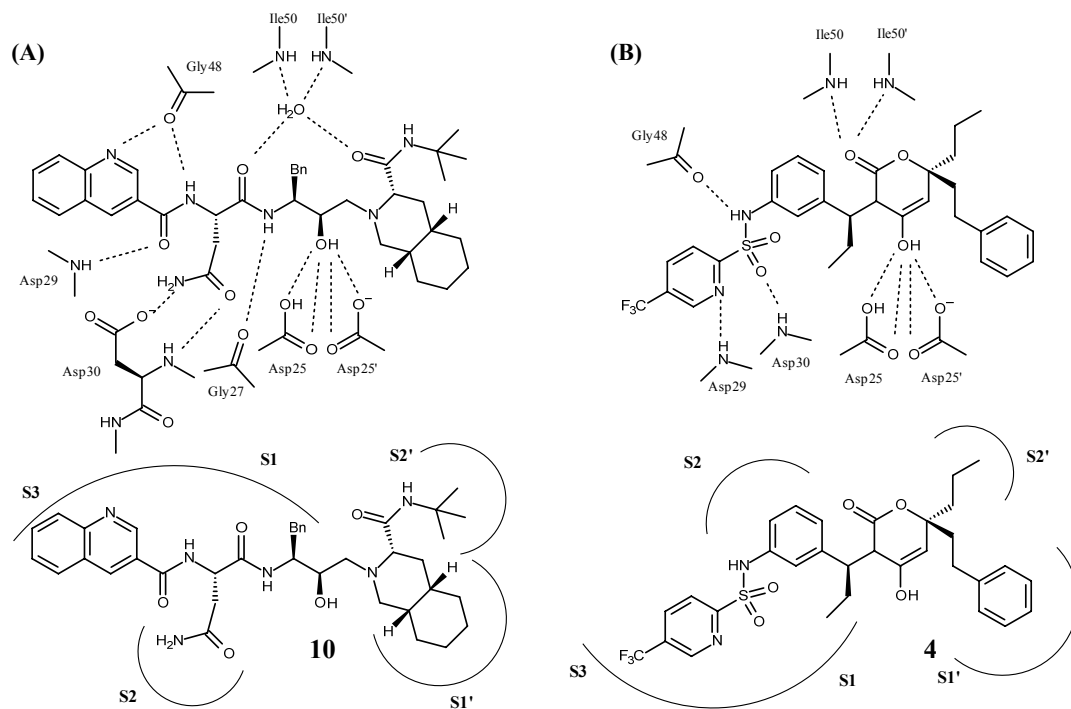


Abbildung 10: Bindungsmodi und Taschenbesetzung der Arzneistoffe (A) Saquinavir **10** und (B) Tipranavir **4** im Komplex mit der HIV-Protease.

Tipranavir **4** weist als Grundstruktur ein Dihydropyron auf, das von der *Pfizer Inc.* in einem klassischen Leitstrukturoptimierungsprozess von Warfarin ausgehend entwickelt worden ist. Tipranavir bindet mit der Hydroxygruppe an die katalytische Dyade, und das Sauerstoffatom der Carbonylfunktion adressiert die Isoleucine 50 und 50' der Flapregion direkt unter Verdrängung eines Wassermoleküls („Flap-Wasser“). Die Substituenten am zentralen Ring reichen, wie in der **Abbildung 10** dargestellt, in die Subtaschen hinein. Bei Saquinavir **10** wird das katalytische Zentrum ebenfalls durch eine Hydroxygruppe adressiert. Der entscheidende Unterschied allerdings zeigt sich in der Interaktion mit der *Flap*. In diesem Fall wird die *Flap* nicht direkt adressiert, sondern die Interaktion wird über das „Flap-Wasser“ vermittelt.

Alle neun Medikamente werden oral appliziert, obwohl die Absorption sowie die Membrangängigkeit als moderat bis schlecht eingestuft werden kann. Dieser Effekt kommt teils durch die hohe Plasma-Eiweißbindung (90-99 %), teils durch die Bindung an P-Glykoproteine und in Folge durch die schnelle Ausschleusung aus dem Körper zustande. Die daraus resultierende niedrige Wirkstoffkonzentration am Zielenzym stellt durch die anhaltende Virusreplikation einen Risikofaktor für die Resistenzbildung des Virus gegen den Arzneistoff dar. Um dieses Risiko zu verringern, werden u. a. niedrige

Dosen eines sogenannten „*boosters*“ zugesetzt, der die Wirkstoffkonzentration des eigentlichen Arzneistoffs erhöhen soll.

Ritonavir, ebenfalls ein HIV-Protease-Inhibitor, wird zu diesem Zweck mit einem weiteren HIV-Protease-Inhibitor ko-formuliert. Ritonavir verringert als ein potenter Inhibitor des Cytochrom P450 den *first-pass*-Effekt des eigentlichen Arzneistoffs. Mit Tipranavir 4 hoffte Boehringer Ingelheim, durch die weniger peptidische Struktur und des andersartigen Bindungsmodus die Bioverfügbarkeit zu erhöhen und gleichzeitig die Resistenanfälligkeit sowie die Toxizität zu verringern. Zwar konnte die Bioverfügbarkeit verbessert werden, allerdings wird die Anwendung durch die hohe Lebertoxizität stark eingeschränkt. Damit werden weiterhin die peptidischen Wirkstoffe wie Lopinavir, Fosamprenavir und Darunavir als Wirkstoffe der ersten Wahl in der Therapie eingesetzt.

1.3 Endothiapepsin

Endothiapepsin ist ein Vertreter der pepsinartigen Aspartat-Proteasen (A1) und hauptsächlich in Pilzen zu finden. Damit stellt Endothiapepsin kein direktes Zielenzym für die Arzneimittelentwicklung dar, wird aber oft als Modellsystem für die Entwicklung neuer Leitstrukturen nah verwandter Aspartat-Proteasen wie z. B. Renin oder BACE1 herangezogen. Endothiapepsin zeigt große Homologien mit anderen Mitgliedern seiner Familie. Ein struktureller Vergleich der α -C-Atome von Endothiapepsin mit Renin spiegelt die Ähnlichkeit der Faltungsmuster in einem rmsd-Wert (engl. *root-mean-square deviation*) von 2 Å wider. Betrachtet man nur die Bindetaschen der beiden Enzyme, sind die Homologien mit einem rmsd-Wert von unter 0,5 Å noch deutlicher. [71] Modellsysteme im strukturbasierten Wirkstoffdesign anzuwenden, wurde schon 1998 von L. Mario Amzel als eine praktikable Möglichkeit angesehen, um neue Leitstrukturen zu identifizieren. [72] Basierend auf dieser Methodik wurden neuartige Renin-Inhibitoren entwickelt, deren Grundstruktur mit Hilfe von Endothiapepsin gefunden werden konnte. [73] Endothiapepsin wird aktuell vermehrt als Modell für die β -Sekretase BACE1 verwendet und entsprechende Ergebnisse wurden in diversen Veröffentlichungen vorgestellt. [74-76] Die hohe Homologie von BACE1 zu Endothiapepsin wird u. a. in einem Übersichtsartikel von Katharine Holloway aus dem Jahr 2009 hervorgehoben. [77] Die Überlagerung der Kristallstrukturen von BACE1 mit Renin, Pepsin und Cathepsin D im Vergleich mit der Überlagerung von BACE1 mit Endothiapepsin ergab, dass die Pilz-Aspartat-Protease BACE1 ähnlicher ist als die humanen Aspartat-Proteasen Renin, Pepsin und Cathepsin

D. Die Übereinstimmungen beziehen sich nicht nur auf das katalytische Zentrum, sondern auch auf die Subtaschen S1'/S3'. Auch für die HIV-Protease sind Beispiele bekannt, in denen affine Grundstrukturen mittels Endothiapepsin identifiziert wurden. [78] Zusätzlich überzeugt Endothiapepsin als Modellenzym durch seine einfache und relativ preiswerte kommerzielle Erhältlichkeit, die schnelle und problemlose Aufreinigung sowie die gute Kristallisierbarkeit.

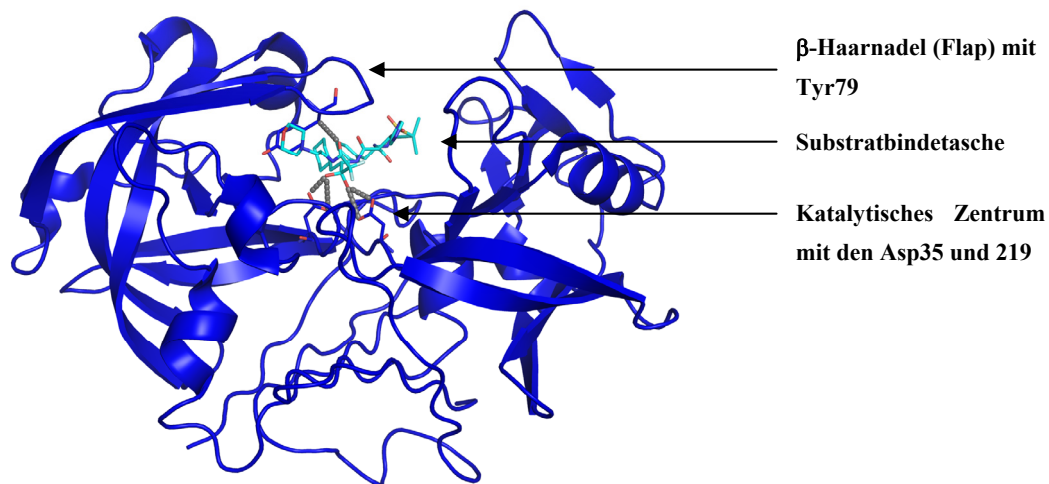


Abbildung 11: 3D-Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit einem α -Difluor-gem-Diol-Inhibitor (pdb-Code: 2JJI). Das Diol des Inhibitors adressiert die Aspartate 35 und 219, und die Flap wird über die Interaktion von der Carbonylgruppe zum Rückgrat-NH des Tyr79 geschlossen.

Die allgemeine Struktur von Mitgliedern der Familie A1 wurde bereits in Abschnitt 1.1.2 sehr detailliert vorgestellt. Hier seien deshalb nur noch kurz die wichtigsten strukturellen Merkmale von Endothiapepsin erwähnt: Endothiapepsin, in **Abbildung 11** dargestellt, ist ein bilobales Enzym und besteht aus 330 Aminosäuren, die sich in 20 β -Faltblättern und fünf kleinen α -Helices organisieren. Das katalytische Zentrum wird durch die Aspartate 35 und 219 aufgebaut, die im hoch konservierten Sequenzmotiv Asp-Thr-Gly lokalisiert sind. Die Bindetasche wird durch eine N-terminale Haarnadelschleife, der *Flap*, gegenüber dem Solvens abgeschirmt. Innerhalb dieser Schleife ist das Tyr79 lokalisiert, das spezifische Interaktionen mit dem Substrat eingeht und dieses so fixiert. [25]

1.4 Fazit und Aufgabenstellung

Nach der Entdeckung des HI-Virus als Auslöser von AIDS sind mehr als 20 verschiedene Präparate gegen diese Erkrankung in die klinische Praxis eingeführt worden. Damit sind gegen AIDS mehr Virostatika erhältlich als gegen alle anderen Viruserkrankungen gemeinsam. 1995 wurde der erste HIV-Protease-Inhibitor in der HAART (engl. *Highly Active Antiretroviral Therapy*) eingesetzt, und es gelang, sowohl die Lebensqualität als auch die Lebenserwartung der Patienten unter dieser Therapie deutlich zu erhöhen. Trotz des großen Erfolges von HAART ist es unverzichtbar, dass sowohl akademische Institutionen als auch die pharmazeutische Industrie die Bemühungen fortsetzen, um potentere und insbesondere im Hinblick auf den Bindungsmodus andersartige Wirkstoffe zu entwickeln. Zum einen stellt die Resistenzbildung gegen die aktuell verfügbaren Medikamente ein gravierendes Problem dar. Zum anderen erfordern die schlechten Bioverfügbarkeiten und hohen Toxizitäten der zugelassenen Wirkstoffe weitere Verbesserungen und machen die Forschung auf diesem Gebiet weiterhin unabdingbar.

Nebenwirkungen wie beispielsweise Durchfall und Erbrechen verkürzen die Plasmahalbwertszeit im Organismus, wodurch die Evolution der Resistenzen zusätzlich unterstützt wird. Des Weiteren besitzen acht der neun HIV-Protease-Inhibitoren nicht nur ein identisches Strukturelement zur Adressierung des katalytischen Zentrums, sondern ähneln sich zusätzlich sehr in ihrem Bindungsmodus. Diese Ähnlichkeiten spiegeln sich in der Anfälligkeit gegen gleichartige Mutationen wider. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung neuer HIV-Protease-Inhibitoren mit einer breiten Spezifität gegen resistente HIV-Mutanten, guten pharmakokinetischen Eigenschaften, niedriger Toxizität und einfacher Dosierung wünschenswert.

Auch unter den Mitgliedern der Pepsin-Familie gibt es vielversprechende Zielenzyme, deren Bedarf nach neuartigen Leitstrukturen noch nicht gedeckt ist. Das einzige zugelassene Medikament für die Inhibition des Enzyms Renin ist Aliskiren **1**, für Cathepsin D und für BACE1 hat es trotz intensiver Forschungsbemühungen noch kein Wirkstoff bis zur Markteinführung geschafft.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung neuer Grundstrukturen für die Inhibition von Aspartat-Proteasen. Dabei sollen die Familien A1 und A2 der Aspartat-Proteasen in den Mittelpunkt der Betrachtung gestellt werden. Als ein Modellsystem der Familie A1 wurde aus den bereits in Abschnitt 1.3 aufgeführten Gründen das Enzym Endothiapepsin ausgewählt. Ein repräsentatives und das wohl bedeutendste Mitglied der Familie A2 ist die HIV-Protease, welche folglich als der Vertreter dieser Klasse

gewählt wurde. Für die beiden Modellsysteme sollten im Rahmen dieser Arbeit neuartige Leitstrukturen sowohl entworfen als auch synthetisiert und deren Aktivität gegen die ausgewählten Aspartat-Proteasen bestimmt werden.

2 NEUARTIGE OFFENKETTIGE INHIBITORKLASSEN

2.1 Einleitung

Benedikt Sammet stellte in seiner Diplomarbeit lineare, synthetisch einfach zugängliche und auf einem Oligoamingrundgerüst basierte Inhibitoren gegen Aspartat-Proteasen dar. Diese zeigten, mit entsprechenden Substituenten dekoriert, Affinitäten im unteren einstellig mikromolaren Bereich gegenüber einzelnen Vertretern der Familien A1 und A2. Darüber hinaus dienten die Liganden als Sondenmoleküle, um entsprechende Selektivitätsprofile der jeweiligen Protease zu erstellen. Die synthetisierten Verbindungen und deren Affinitätsdaten gegenüber der HIV-Protease sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

11-14

15a-c

	R2	R1	m	n	HIV-Protease K _i /[μM]
11a			1	1	3,8
11b			1	2	14,1
11c			2	2	k. I.
12a			1	1	9,6
12b			1	2	k. I.
12c			2	2	k. I.
13a			1	1	10,0
14a			1	1	0,9
15a			1	1	k. I.
15b			1	2	k. I.
15c			2	2	k. I.

Tabelle 1: K_i-Werte der Oligoamin-Derivate gegen die HIV-1-Protease; Tabelle entnommen aus [79].

Die zentrale, sekundäre Aminfunktionalität dieser Inhibitoren adressiert die katalytische Dyade, und die distalen Aminfunktionalitäten erlauben die Einführung geeigneter Akzeptorgruppen ($-\text{SO}_2$ oder $-\text{C}=\text{O}$), die die Flapregion adressieren können. Hydrophobe Reste am Sulfonamid bzw. Carboxamid wurden eingeführt, um die Spezifitätstaschen S2 und S2' zu besetzen. Ein weiterer Alkylierungsschritt der distalen Stickstoffatome erlaubt die Einführung zusätzlicher, hydrophober Substituenten, die in die S1- und S1'-Tasche hineinragen können. Durch Variation der Kettenlänge konnte die optimale Distanz zwischen Amin und Akzeptorgruppe analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung für die HIV-Protease sind in **Tabelle 1** dargestellt. [79]

Im Falle der HIV-Protease zeigt sich eine deutliche Präferenz für Inhibitoren, die den Ethylenlinker und das Sulfonamid-Motiv in ihrer Struktur aufweisen. Das Sulfonamid (wie in **11-14**) besitzt im Vergleich zum Carboxamid (wie in **15a-c**) zusätzliche Rotationsfreiheitsgrade und scheint dadurch bessere Affinitäten zu erzielen. Allerdings erweist sich die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Substituenten in der S1-Tasche als uneindeutig. Im Fall der 4-Aminophenyl-Derivate zeigt der *iso*-Butylrest (**14a**) eine um den Faktor 11 erhöhte Affinität im Vergleich zum Benzyl-Rest (**12a**). Die Betrachtung der entsprechenden Derivate mit einer unsubstituierten Phenylgruppe in der S2-Tasche, ergibt sich der umgekehrte Zusammenhang. Das *iso*-Butyl-Derivat **13a** liefert im Vergleich zum Benzyl-Derivat **11a** einen 2,5-fach geringeren Affinitätswert. Dieses Verhalten deutet auf unterschiedliche Bindungsmodi dieser Verbindungsklassen hin. Die Bindungsmodi der beiden 4-Aminophenylsulfonamid-Derivate **12a** und **14a** wurden mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt und sind in **Abbildung 12** dargestellt. Das zentrale sekundäre Amin ist in beiden Komplexen nicht mittig zwischen den beiden katalytischen Aspartaten lokalisiert und kann somit nur zu einem Aspartat günstige Wechselwirkungen aufbauen. In beiden Fällen werden die Isoleucine der Flapregion über ein Wassermolekül vermittelt adressiert, allerdings in unterschiedlicher Weise. In **Abbildung 12 (A)** ist das Wassermolekül zwischen den Isoleucinen 50 und 50' positioniert und vermittelt die Interaktion jeweils zu einem Sauerstoffatom jeder Sulfongruppe. Im Gegensatz dazu ist in der Struktur des *iso*-Butyl-Derivats **14a** das Wassermolekül stark verschoben, so dass dieses nur noch zwischen dem Isoleucin 50 der Flapregion und den beiden Sauerstoffatomen jeweils einer Sulfongruppe vermitteln kann. Zusätzlich kann aber das zweite Sauerstoffatom der einen Sulfongruppe das Isoleucin 50' direkt adressieren.

Die Idee zur Darstellung neuartiger, offenkettiger Derivate entwickelte sich aus der genauen Analyse der Bindungsmodi der beiden Oligoamine **12a** und **14a**. Die Adressierung der Flapregion scheint nicht optimal, ebenso wie die Interaktion des

sekundären Amins mit dem katalytischen Zentrum. Durch Annäherung der Sulfongruppen an die Isoleucine der Flapregion könnte eventuell eine Verdrängung des „*Flap*-Wassers“ initiiert und dadurch der Entropiebeitrag zur Bindungsenergie erhöht werden.

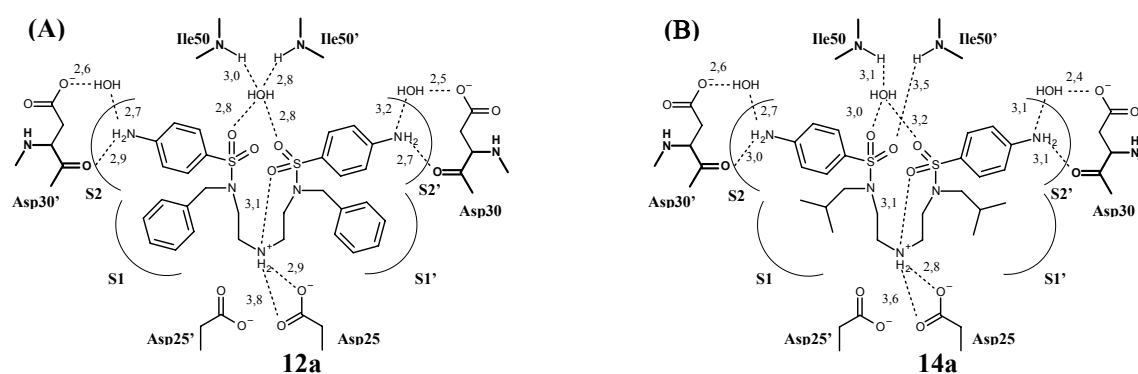
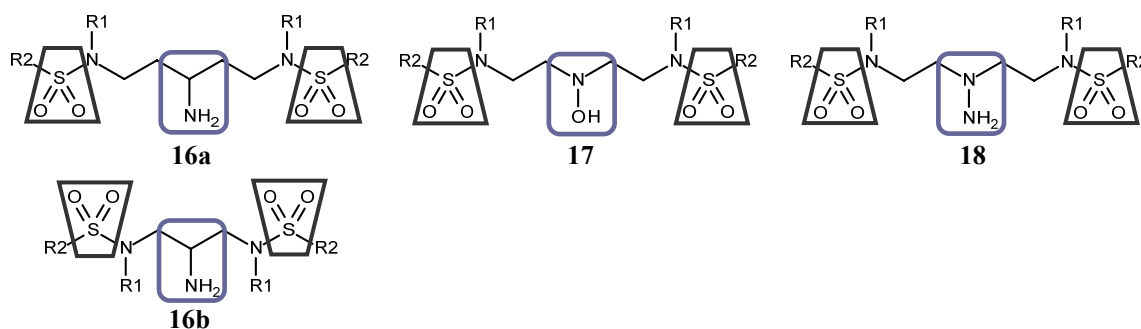



Abbildung 12: Schematische Darstellung der Bindungsmodi der Oligoamine **12a** und **14a** im Komplex mit der HIV-Protease. Gestrichelte Linien beschreiben Wasserstoffbrücken, Abstände sind in Å angegeben. [79]

Die Lokalisierung des zentralen Strukturelements zur Adressierung des katalytischen Zentrums könnte ebenfalls verbessert werden, indem es mittig zwischen den Aspartat-Resten positioniert wird. In dieser Position wäre es möglich, zu beiden Aspartaten Wasserstoffbrücken auszubilden und dadurch einen zusätzlichen Energiegewinn zu erreichen. Um diese Ziele umzusetzen, sollte das zentrale Strukturelement (-NH) aus der Kette herausgezogen werden. In Annäherung an die hoch affinen Statin- bzw. Norstatin-Derivate könnte zur Adressierung ebenfalls eine Hydroxyfunktionalität in Betracht gezogen werden. Besonderes Augenmerk sollte jedoch auf die einfache Synthetisierbarkeit gelegt werden, so dass die Einführung eines chiralen Zentrums möglichst vermieden wird. Vor diesem Hintergrund schienen Strukturelemente wie primäre Amine **16a-b**, Hydroxylamine **17** und Hydrazine **18**, wie sie in **Abbildung 13** dargestellt sind, besonders interessant zu sein.



 Strukturelement zur Adressierung des katalytischen Zentrums

 Akzeptorgruppe zur Adressierung der *Flap*

R1 : Besetzung der S1-Taschen; **R2** : Besetzung der S2-Taschen

Abbildung 13: *Neuartige Grundgerüste, abgeleitet von den Oligoamin-Derivaten, die aus vorangegangenen Arbeiten in unserem Arbeitskreis entstanden sind.*

Der im Falle der HIV-Protease für die Oligoamine bevorzugte Ethylenlinker sollte zunächst auf die Entwicklung der neuartigen Inhibitoren übertragen werden. Zur Überprüfung, ob auch mit dem neuen zentralen Strukturelement dieselbe Linkerlänge begünstigt wird, sollten die primären Amine sowohl mit der Linkerlänge 2/2 **16a** als auch mit 1/1 **16b** dargestellt werden. Für die Besetzung der Spezifitätstaschen wurden hydrophobe Reste gewählt, die bekanntermaßen gute Kontakte in der jeweiligen Tasche aufweisen. Für die S2-Tasche wurde der 4-Aminophenyl- sowie der 4-Carboxamid-Substituent selektiert. Die Besetzung der S1-Tasche sollte beispielsweise durch *iso*-Butyl-, Benzyl-, Naphthyl- und 4-CF₃-Benzyl-Reste erreicht werden.

2.2 Rationales Design der offenkettigen Derivate

2.2.1 Docking

Abhängig vom jeweiligen Strukturelement, das das katalytische Zentrum der Aspartat-Proteasen adressiert, variiert der Protonierungszustand des Carboxylates in der Seitenkette der Asparaginsäure. In **Abbildung 14** sind drei Möglichkeiten aufgezeigt, in welcher Form das Wasserstoffbrückennetzwerk mit unterschiedlichen Liganden aufgebaut werden kann. In **Abbildung 14 (A)** adressiert ein vicinales Diol die katalytische Dyade, während beide Aspartate 25 und 25' protoniert vorliegen und auf die dargestellte Weise ein Wasserstoffbrückennetzwerk aufbauen können. Im zweiten Fall befindet sich ein Aspartat im deprotonierten und das andere im protonierten Zustand, wenn eine Hydroxyfunktionalität das zentrale Strukturelement des Liganden darstellt (**Abbildung 14 (B)**). Adressiert der Inhibitor das katalytische Zentrum mit einem sekundären Ammonium-Ion, so liegen beide Aspartate im deprotonierten Zustand vor, um geeignete Wasserstoffbrücken aufbauen zu können (**Abbildung 14 (C)**). Die vorgeschlagenen Protonierungszustände werden zum Teil durch experimentelle Daten (NMR [80], Neutronenbeugung, ITC [81-84]) und zum anderen durch pK_a -Rechnungen unter Verwendung der Poisson-Boltzmann Gleichung nahegelegt. [85]

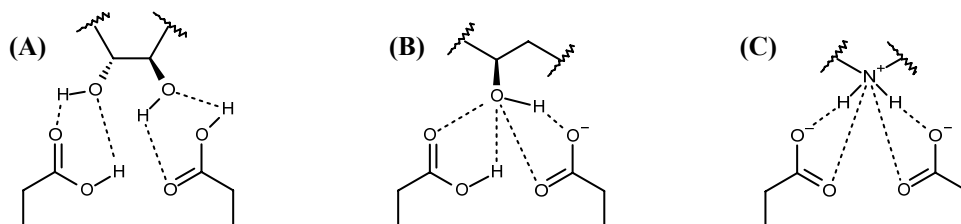


Abbildung 14: Unterschiedliche Protonierungszustände der katalytischen Aspartate 25 und 25'; **(A)** aus Kristallstruktur 1QBS mit einem vicinalen Diol als Ligand, und beide Aspartate liegen protoniert vor; **(B)** in der Struktur mit Amprenavir ist ein Aspartat protoniert, das andere deprotoniert (pdb: 3NU3); **(C)** beide Aspartate sind deprotoniert, wenn ein Amin gebunden ist (pdb: 3BGC).

In den Dockingexperimenten mit den Hydroxylaminen **17** wurde besonderes Augenmerk auf die Protonierungszustände sowie die Ausrichtung der Wasserstoffe der Aspartate gelegt. Des Weiteren wurden die Experimente sowohl in An- als auch in

Abwesenheit eines Wassermoleküls in der Flapregion durchgeführt. In der Kristallstruktur des zyklischen Harnstoffs DMP-323 (pdb-Code: 1QBS), der mit einem K_i -Wert von 0,34 nM einen hoch potenten Inhibitor darstellt, ist das Wassermolekül in der Flapregion durch den Liganden verdrängt. [55] Die Struktur des *iso*-Butyl-Derivats **14a** der Oligoamine (pdb-Code: 3BGB) enthält ein in die Interaktion zu den Isoleucinen involviertes Wassermolekül, das im Dockingexperiment berücksichtigt werden kann. Wie bereits in **Abbildung 12** dargelegt wurde, befindet sich dieses Wassermolekül nicht mittig zwischen den Isoleucinen 50 und 50', wie es beispielsweise in der Kristallstruktur des Amprenavirs (pdb-Code: 3NU3) der Fall ist. Durch direkten Vergleich dieser beiden Strukturen ergibt sich für das Wassermolekül eine Verschiebung von 3 Å. Durch Überlagerung der drei erwähnten Kristallstrukturen (1QBS, 3BGB und 3NU3) wird deutlich, dass die direkte Interaktion des DMP-323-Liganden zur Flapregion keine Bewegung der β -Haarnadeln hin zu einer stärker geschlossenen Konformation resultiert. Demzufolge konnte für das Dockingexperiment auf den Einsatz der Kristallstruktur 1QBS verzichtet und die beiden Kristallstrukturen 3BGB und 3NU3 verwendet werden. Diese beiden Strukturen enthalten ein Wassermolekül in der Flapregion, das allerdings an unterschiedlichen Positionen zu finden ist. Für beide Strukturen wurde jeweils in einem Experiment das besagte Wassermolekül als notwendige Bedingung und Interaktionspartner zum Liganden gesetzt und in einem weiteren vernachlässigt. Als zweites Kriterium sollten die möglichen Protonierungszustände der katalytischen Dyade herangezogen werden, wobei die Variante mit den beiden deprotonierten Aspartaten von vornherein ausgeschlossen werden konnte. Folglich wurden pro Struktur vier Dockingexperimente mit dem Dockingprogramm FlexX durchgeführt. Dazu wurden im ersten Schritt eine Bindetasche mit einem Radius von 7 Å um den Original-Liganden sowie die verschiedenen Protonierungszustände der Aspartate definiert. Ausgewählte Verbindungen wurden mittels FlexX mit Standardparametern in die Bindetaschen der acht Varianten eingepasst. Für jedes Molekül wurden 20 Posen generiert und nach FlexX-Score bewertet. Anschließend wurden durch visuelle Inspektion fünf plausible Posen ausgewählt, die voneinander möglichst unterschiedlich sein sollten. Diese wurden im Anschluss durch das Programm MiniMuDS [86] in der Bindetasche minimiert und nachfolgend mit DrugScore (DSX_pdb) [87] neu bewertet. Die beiden am besten bewerteten Bindungsmodi aller durchgeführten Dockingexperimente sind in **Abbildung 15** und **Abbildung 16** dargestellt.

In **Abbildung 15** sind die Dockinglösungen nach erfolgter Minimierung für die Kristallstruktur 3BGB gezeigt. Die besten Ergebnisse konnten unter Einbeziehung des

Wassermoleküls der Flapregion sowie mit der Protonierung beider Aspartate erhalten werden. Unter diesen Voraussetzungen wird das Hydroxylamin als zentrales Strukturmotiv zwischen die beiden katalytischen Aspartat-Reste positioniert und bildet zu diesen ein neuartiges, interessantes Wasserstoffbrückennetzwerk aus (**Abbildung 15 (A)**).

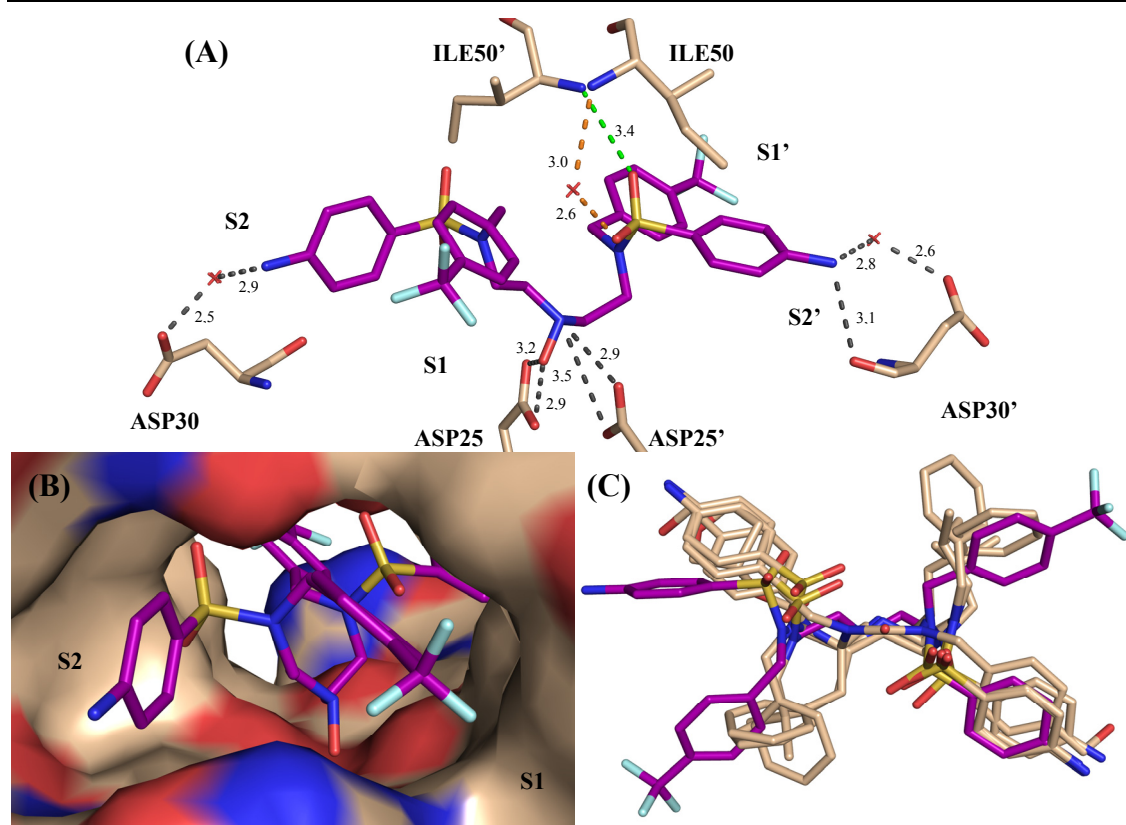


Abbildung 15: Die am besten bewertete Dockinglösung aus der Kristallstruktur 3BGB mit protonierten Aspartaten 25 und 25' sowie unter Einbeziehung des „Flap-Wassers“; mittels FlexX generierte Dockinglösungen nach anschließender Minimierung mit MiniMuDS und Nachbewertung mit DrugScore in violett; (A) und (B): Vorgeschlagener Bindungsmodus und Taschenbesetzung des Hydroxylamin-Liganden; gestrichelte Linien beschreiben Wasserstoffbrücken und Abstände sind in Å angegeben; (C): Überlagerung mit potenten HIV-Protease-Inhibitoren in beige.

Der eingepasste Ligand adressiert das katalytische Zentrum sowohl mit der Hydroxyfunktionalität als auch mit dem Stickstoffatom des Hydroxylamin-Motivs. Der generierte Ansatz zur Adressierung der Aspartate 25 und 25' erscheint plausibel, denn durch den sogenannten α -Effekt ist das Stickstoffatom des Hydroxylamins im Vergleich zum Amin sogar nukleophiler und könnte damit in der Lage sein, eine Protonenakzeptor-Funktion einzunehmen. Damit ist das Stickstoffatom befähigt mit

einem Aspartat zu interagieren, was auch in der Kristallstruktur des Oligoamins **14a** gezeigt werden konnte. Die zusätzliche Hydroxygruppe könnte dann das zweite Aspartat adressieren und so die Interaktionen zum katalytischen Zentrum verbessern. Für die Interaktion mit den Isoleucinen 50 und 50' der Flapregion, an der nur eine Sulfongruppe beteiligt ist, wird sowohl eine direkte als auch eine wasservermittelte Wechselwirkung vorhergesagt. Dabei baut ein Sauerstoffatom des Sulfons eine Wasserstoffbrücke zum „*Flap*-Wasser“ auf, welches wiederum mit Isoleucin 50 in Kontakt steht. Das zweite Sauerstoffatom der gleichen Sulfongruppe ist so positioniert, dass es direkt mit dem Rückgrat-NH des Isoleucin 50' eine Wasserstoffbrücke aufbauen kann. Die Taschenbesetzung der Substituenten ist der der Oligoamine **12a** und **14a** sehr ähnlich. Die 4-Aminophenyl-Reste werden in die S2-Taschen platziert und können dort mit der aromatischen Aminfunktionalität zu den Aspartaten 30 und 30' gerichtete Wechselwirkungen eingehen. Die hydrophoben Substituenten ragen in die S1-Tasche hinein und füllen diese ebenfalls sehr gut aus. Zur besseren Veranschaulichung ist die Taschenbesetzung in **Abbildung 15 (B)** und **(C)** genauer dargestellt. An der Überlagerung mit unterschiedlichen HIV-Protease-Inhibitoren wird zusätzlich deutlich, dass es mit diesem Grundgerüst möglich ist, die Spezifitätstaschen entsprechend gut zu adressieren.

Unter Verwendung der Kristallstruktur 3NU3 des Amprenavirs ergab sich für den in **Abbildung 16** dargestellten Bindungsmodus die am besten bewertete Dockinglösung, in der ein Aspartat des katalytischen Zentrums protoniert und das zweite deprotoniert vorliegt. Im Gegensatz zum ersten Beispiel generiert hier das Dockingprogramm ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der Hydroxygruppe des Hydroxylamins und den katalytischen Aspartaten in Übereinstimmung mit dem Bindungsmodus von Amprenavir. Das Stickstoffatom des zentralen Motivs des Liganden wird in diesem Fall nicht in die Interaktion zum katalytischen Zentrum miteinbezogen. Bedingt durch das um 3 Å verschobene Wassermolekül der Flapregion im Vergleich zum ersten dargestellten Beispiel ist das Wasserstoffbrückennetzwerk hier etwas anders aufgebaut. Dabei adressiert ein Sauerstoffatom einer Sulfongruppe das Isoleucin 50' direkt und baut zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zum „*Flap*-Wasser“ auf. Des Weiteren bildet auch das zweite Sauerstoffatom des gleichen Sulfons eine solche Wasserstoffbrücke aus. Das Wassermolekül wiederum interagiert mit den Rückgrat-NHs der Isoleucine 50 und 50'. Ein weiterer Unterschied ergibt sich in der Taschenbesetzung durch die Substituenten.

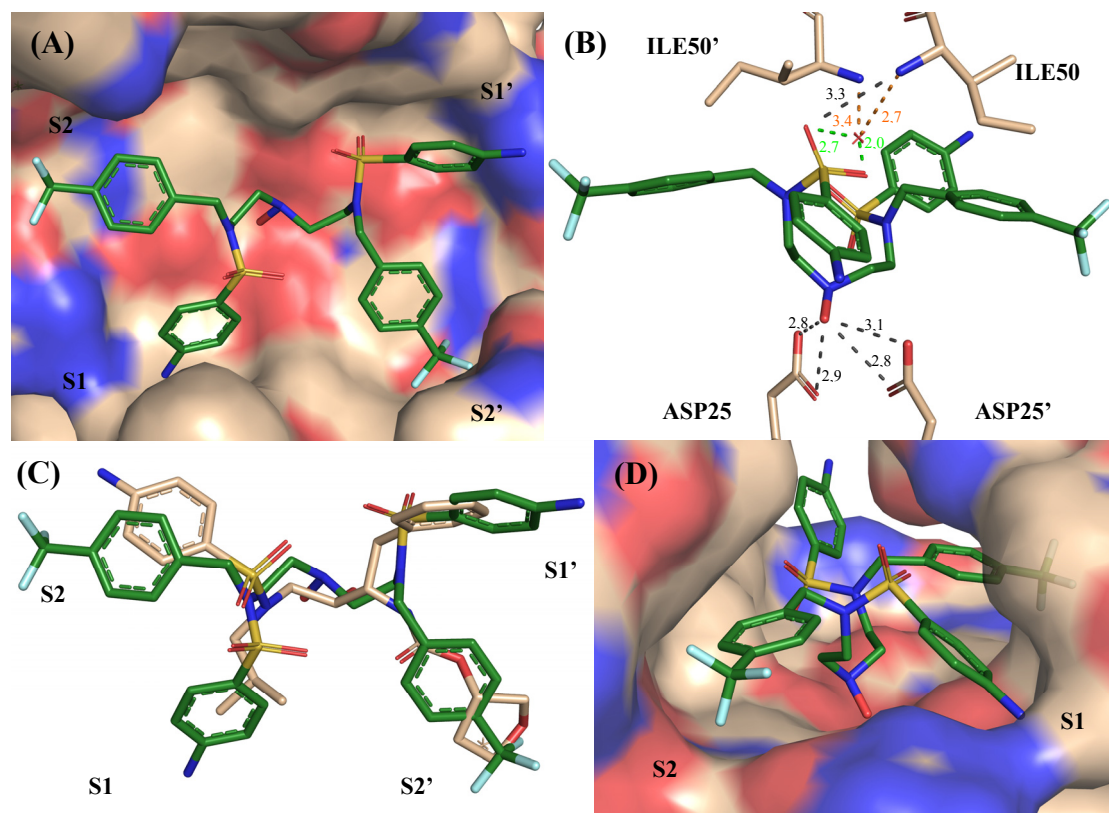


Abbildung 16: Die am besten bewertete Dockinglösung aus der Kristallstruktur 3NU3 mit einem protonierten und einem deprotonierten Aspartat sowie unter Einbeziehung des „Flap-Wassers“; die mittels FlexX generierte Dockinglösung nach anschließender Minimierung mit MiniMuDS und Nachbewertung mit DrugScore ist in grün dargestellt; (A) und (D): Vorgeschlagener Bindungsmodus und Taschenbesetzung des Hydroxylamin-Liganden; (B): Wasserstoffbrückennetzwerk des Hydroxylamins mit den katalytischen Aspartaten 25 und 25' sowie Interaktion des Sulfons sowohl direkt als auch wasservermittelt zu den Isoleucinen 50 und 50'; (C): Überlagerung mit Amprenavir aus der Kristallstruktur 3NU3 in beige.

Die 4-Aminophenyl-Reste werden in die S1-Taschen platziert, während die hydrophoben Reste in die S2-Tasche ragen. Auf diese Weise kann keine gerichtete Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Amin und den Aspartaten 30 in der S2-Tasche aufgebaut werden, wodurch potentiell ein Verlust der Affinität resultieren könnte. Dennoch werden die beiden vorgestellten Dockinglösungen nach Minimierung mit MiniMuDS von DrugScore fast identisch gut bewertet ($\text{DrugScore}_{3\text{NU}3}$: -241.691; $\text{DrugScore}_{3\text{BGB}}$: -213.396). Beide Hypothesen zu einem möglichen Bindungsmodus erscheinen auf verschiedene Weisen plausibel. Es bleibt zu überprüfen, welche der Dockinglösungen dem realen Bindungsmodus besser entspricht.

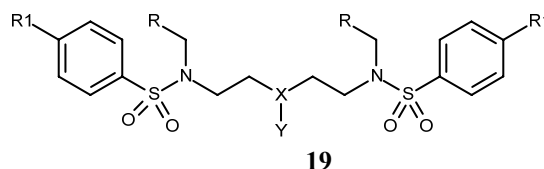


Abbildung 17: Aufbau der neuartigen offenkettigen Liganden mit $R = \text{hydrophobe Reste}$; $R1 = \text{NH}_2, \text{CONH}_2$; $X\text{-}Y = \text{N-OH}$; C-NH_2 ; N-NH_2 .

Nach den obigen Ergebnissen sollten daher Verbindungen der Grundstruktur **19** dargestellt werden. Die Dockingexperimente der analogen offenkettigen primären Amine zeigten sehr ähnliche Bindungsmodi im Vergleich zu den Hydroxylaminen, wobei hier beide Aspartate als deprotonierte Reste festgelegt wurden. Daher wird hier auf die Vorstellung der generierten Dockinglösungen verzichtet.

2.2.2 Darstellung der Hydroxylamine

In **Abbildung 18** ist die Retro-Synthese für die Darstellung der Hydroxylamin-Derivate **17** gezeigt. Startpunkt der Synthese ist das Ethansulfonamid **20**, das in einer intramolekularen Ringschlussreaktion zum entsprechenden Aziridin **22** umgewandelt wird. Dieses reagiert im nächsten Schritt mit einem halben Äquivalent des geschützten Hydroxylamins **21** in einer nukleophilen Ringöffnungsreaktion. Die resultierende Verbindung **23** lässt sich dann in einer mehrstufigen Reaktionssequenz in das Zielmolekül **17** überführen.

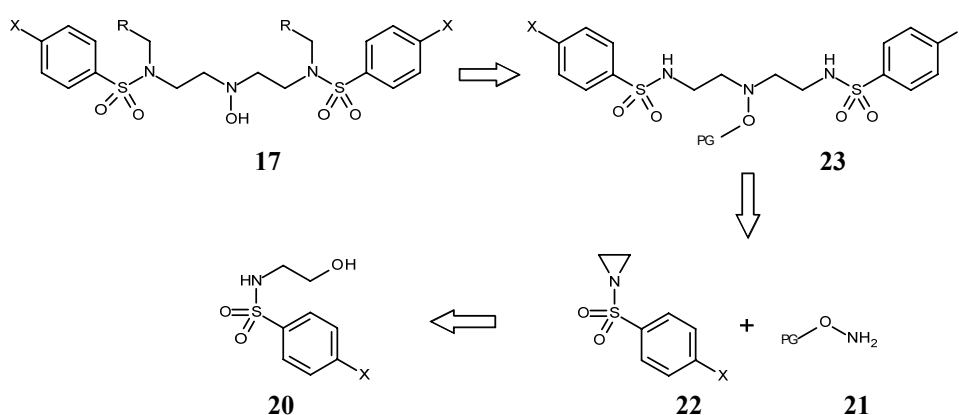


Abbildung 18: Retro-Synthese der Hydroxylamin-Derivate **17**; PG bezeichnet eine Schutzgruppe, R verschiedene überwiegend hydrophobe Substituenten und X Amin bzw. Amid.

In der Reaktionssequenz zur Darstellung der Hydroxylamin-Derivate erwiesen sich sowohl die Synthese als auch die sich anschließende nukleophile Ringöffnung des

Aziridins als Schlüsselschritte. Darüber hinaus war die Wahl einer geeigneten Schutzgruppe für das Hydroxylamin nicht trivial. Keines der beiden *p*-phenylsubstituierten Aziridine **22a** und **22b** (**Abbildung 19**) war zum Zeitpunkt der Darstellung literaturbekannt. Beschrieben sind die Synthesen der entsprechenden *m*- und *o*-Nitrophenyl-Aziridine. [88, 89] Dabei handelt es sich bei vier der fünf publizierten Methoden um eine zweistufige Synthesesequenz, ausgehend vom entsprechend substituierten Ethansulfonamid. Im ersten Schritt wird die Hydroxygruppe in eine gute Abgangsgruppe überführt, üblicherweise durch Darstellung eines Mesylats, die im zweiten Schritt nach Zugabe von Base durch den nukleophilen Angriff des Amins und unter Ausbildung des Dreirings abgespalten wird. Das *p*-Nitrophenyl-Derivat **22a** war überraschenderweise über die Mesylat-Methode nicht zugänglich, da das intermediär detektierbare Aziridin durch die Anwesenheit der Base sofort wieder geöffnet und die Ausgangsverbindung zurück gewonnen wurde. Dieses Verhalten verdeutlicht die Reaktivitätsunterschiede zwischen *p*-Nitrophenyl-Aziridin **22a** und den entsprechenden *m*- bzw. *o*-Nitrophenyl-Derivaten. Für die Darstellung des gewünschten *p*-Nitrophenyl-Aziridins **22a** musste daher nach einer alternativen Darstellungsmethode gesucht werden. In einem Patent von 2003 wurde der Ringschluss für die Darstellung des *o*-Nitrophenyl-Aziridins unter Mitsunobu-Bedingungen durchgeführt. [90] Die Idee der Dreiringbildung mittels einer Mitsunobu-Reaktion wurde daher aufgegriffen, angepasst und wie folgt umgesetzt. In **Abbildung 19** ist die Synthesesequenz der Aziridine **22** nach Optimierung der Ringschlussreaktion dargestellt.

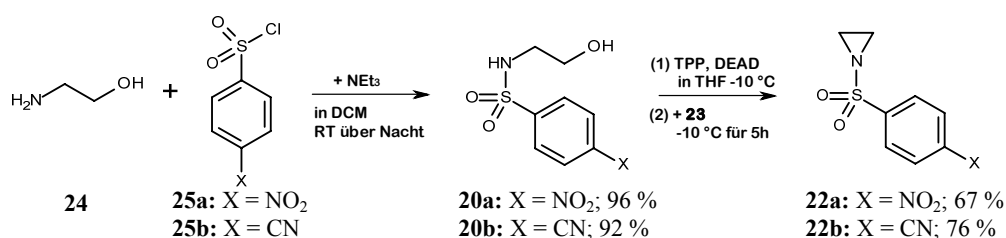
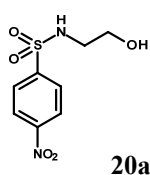


Abbildung 19: Synthese der Aziridin-Zwischenstufen **22a-b** mit Ausbeuten nach Optimierung der Reaktionsbedingungen für den Schritt des Ringschlusses zum Aziridin.

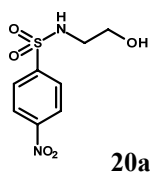
Als Startmaterial diente Ethanolamin **24**, das in einer Additionsreaktion mit den Sulfonylchloriden **25a** und **25b** zu den Ethansulfonamiden **20a** und **20b** reagierte. Die Aziridinbildung beruht auf einer intramolekularen Mitsunobu-Reaktion. Entscheidend für den Erfolg dieser Reaktion waren die Reihenfolge der zugegebenen Reaktanten, die

Temperatur ($< -5\text{ }^{\circ}\text{C}$) und auch die Aufarbeitung. Insbesondere die Nitroverbindung **22a** schien bei gängigen Aufarbeitungsprozessen, wie dem Ausschütteln gegen verdünnte HCl oder NaOH sehr instabil zu sein. Die gegenwärtigen Chlorid- oder Hydroxid-Ionen reagierten sofort mit dem intermediär entstandenen Aziridin in einer nukleophilen Ringöffnungsreaktion unter Bildung des Ethansulfonamids **20a** bzw. des chlorierten Derivats **26**, deren Bildung mittels Massenspektrometrie sowie durch ^1H -NMR belegt werden konnte. Die beiden NMR-Spektren sowie das Referenzspektrum der Ausgangsverbindung sind in **Abbildung 20** dargestellt.

KeLi001



KeLi004



KeLi006

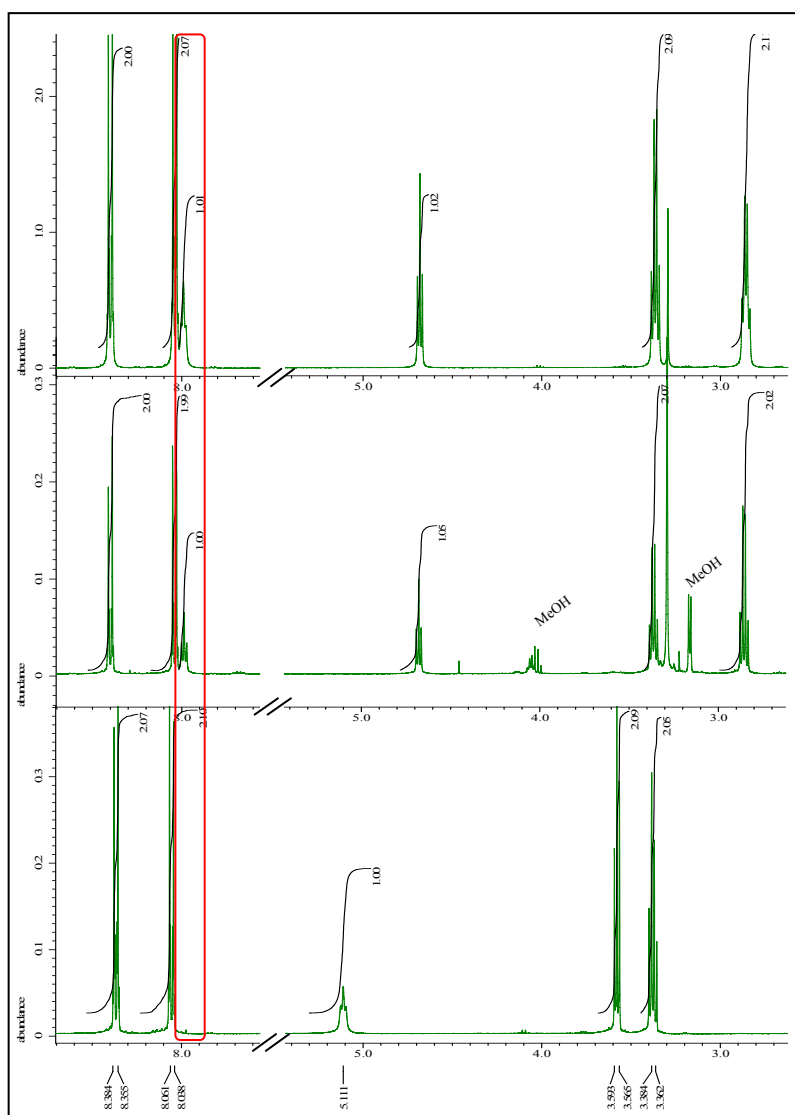
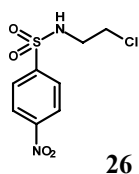


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen KeLi001 **20a**, dem Edukt, sowie von KeLi004 **20a** (Ringöffnung durch OH) und KeLi006 **26** (Ringöffnung durch Cl), den erhaltenen Produkten bei den ersten Versuchen zur Darstellung des Aziridins.

Auch eine Reaktionstemperatur oberhalb von $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ führte zu schlechteren Ausbeuten. Nach sorgfältiger Optimierung der Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen konnten die gewünschten Aziridine **22a** und **22b** schließlich in zufriedenstellenden Ausbeuten von 67 % bzw. 76 % erhalten werden. Im Jahre 2009 erschien eine Synthese des 4-(Nitrophenylsulfonyl)aziridins **22a** in einem Patent, in dem jedoch eine komplett andersartige Syntheseroute verfolgt wurde. [91] Hier wurde 1*H*-Aziridin als Ausgangsverbindung eingesetzt und in einer Alkylierungsreaktion mit 4-Nitrophenylsulfonylchlorid **25a** zum gewünschten Produkt umgesetzt. Auch in dieser Vorschrift fällt auf, dass nach Abschluss der Reaktion keine expliziten Aufarbeitungsschritte durchgeführt wurden, das im Einklang mit den oben erwähnten Beobachtungen aus unseren Versuchen steht. Leider sind in obiger Patentvorschrift keine Ausbeuten für die Darstellung des 4-(Nitrophenylsulfonyl)aziridins **22a** ausgehend vom 1*H*-Aziridin angegeben und dadurch ein direkter Vergleich mit der Mitsunobu-Methode nicht möglich. Allerdings ist zu bedenken, dass das 1*H*-Aziridin nicht kommerziell erhältlich ist und es aufgrund der hohen Tendenz zur Polymerisation in aufwendiger Weise und in relativ schlechten Ausbeuten (35 %) *in situ* hergestellt werden muss. Die am häufigsten verwendete Synthese zur Darstellung des 1*H*-Aziridins ist die Umsetzung von 2-Aminoethylhydrogensulfat mit Natriumhydroxid. [92] Die Schwierigkeit dieser Synthese besteht jedoch darin, die Polymerisation zu unterbinden, indem das Aziridin *in situ* generiert, verdampft und im direkten Anschluss redestilliert wird. Darüber hinaus ist der Dampf des 1*H*-Aziridins (Sdp. $56\text{ }^{\circ}\text{C}$) extrem schleimhautreizend, und die Inhalation verursacht akute Entzündungen des gesamten Bronchialsystems sowie der Augen und Nase. Eine Lagerung von 1*H*-Aziridin ist nur bedingt möglich, da es unter verschiedenen Bedingungen explosionsartig polymerisieren kann. [92] Aufgrund dessen stellt die hier vorgestellte Reaktion unter Mitsunobu-Bedingungen eine erheblich ungefährlichere und weniger aufwendige Variante zur Darstellung der entsprechenden Aziridine dar.

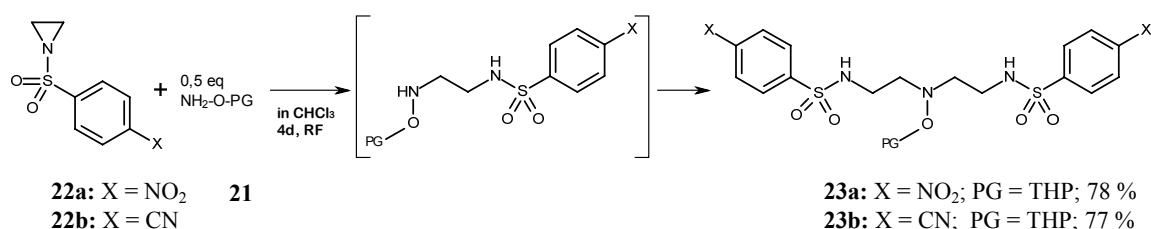


Abbildung 21: Nukleophile Ringöffnung des Aziridins **22** durch das Hydroxylamin **21** nach Optimierung; getestet wurden verschiedene Lösungsmittel zur optimalen Ringöffnung sowie drei unterschiedliche Schutzgruppen.

Im nächsten Schritt sollten zwei Äquivalente Aziridin **22** durch ein Äquivalent des am Sauerstoff geschützten Hydroxylamins **21** geöffnet werden. Wie in **Abbildung 21** dargestellt ist, kann auf diese Weise Verbindung **23** erhalten werden. Ringöffnungsreaktionen durch diverse Nukleophile sind hinlänglich bekannt und Thema verschiedener Übersichtsartikel. [93-97] Vorgestellt werden Ringöffnungen von Aziridinen mit unterschiedlichen Kohlenstoff-, Sauerstoff- und auch Stickstoff-Nukleophilen. Die Ringöffnung mit Hydroxylaminen als ein Stickstoff-Nukleophil wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Erschwerend kommt hinzu, dass das Hydroxylamin-Derivat **21** zunächst nukleophil ein Aziridin öffnen und die entstandene Zwischenstufe nun ihrerseits als Nukleophil in der weiteren Reaktion dienen soll. Eine solche Reaktionsabfolge ist von Argouarch *et al.* durchgeführt worden, allerdings mit einem primären Amin als nukleophilem Agens. [97]

(a)								
	Lösungs- mittel	DCM	Aceto- nitril	DMF	DMSO	DMPU	THF	CHCl ₃
	gewünschtes Produkt in %	< 10 %	< 10 %	< 10 %	x	x	< 10 %	70- 80 %

(b)				
	PG	-Bn	-Allyl	-THP
	Entschützung möglich?	x	x	✓

Tabelle 2: Dargestellt sind in **(a)** die Lösungsmittel, die in der nukleophilen Ringöffnung des Aziridins **22** getestet wurden und die Ausbeuten des gewünschten zweifach substituierten Produkts **23**; in **(b)** die getesteten Schutzgruppen und deren Abspaltbarkeit im letzten Schritt der Synthese.

Die ersten Versuche, das zweifach substituierte Hydroxylamin **23** zu erhalten, scheiterten. Die Ringöffnung eines Aziridinmoleküls konnte zwar beobachtet werden, die Weiterreaktion fand allerdings nicht statt. In **Tabelle 2 (a)** sind die Ergebnisse der Reaktionsoptimierung unter Einsatz verschiedener Lösungsmittel aufgeführt. Mit Chloroform als Lösungsmittel konnte Verbindung **23** in guten Ausbeuten von 70-80 % isoliert werden.

Ein weiteres Problem stellte die Abspaltung der Schutzgruppe des Hydroxylamins im finalen Schritt der Reaktionssequenz dar. Wie **Tabelle 2 (b)** zu entnehmen ist, gelang

die Abspaltung im letzten Schritt der Syntheseroute weder für die Benzyl- noch für die Allyl-Schutzgruppe. Beide Schutzgruppen waren unter milden Reaktionsbedingungen, wie z. B. beim Hydrieren mit Pd/C als Katalysator bei Raumtemperatur, sehr stabil und konnten nicht abgespalten werden. Unter drastischeren Bedingungen, wie beispielsweise dem Refluxieren mit Cyclohexen und Palladium als Katalysator, wurde zwar die jeweilige Schutzgruppe entfernt, allerdings auch das intermediär entstandene Hydroxylamin dabei zerstört. In **Abbildung 22** ist ein ^1H -NMR Spektrum der Verbindung **14a** (KeLi033) gezeigt, die unter diesen Bedingungen entschützt werden sollte. Im Vergleich dazu ist das Spektrum eines Hydroxylamins **30b** (KeLi057) zu sehen, das zu einem späteren Zeitpunkt nach Abspaltung der THP-Schutzgruppe erhalten werden konnte. Die beiden Verbindungen sollten sich nur in der Substitution am Sulfonamidstickstoff unterscheiden.

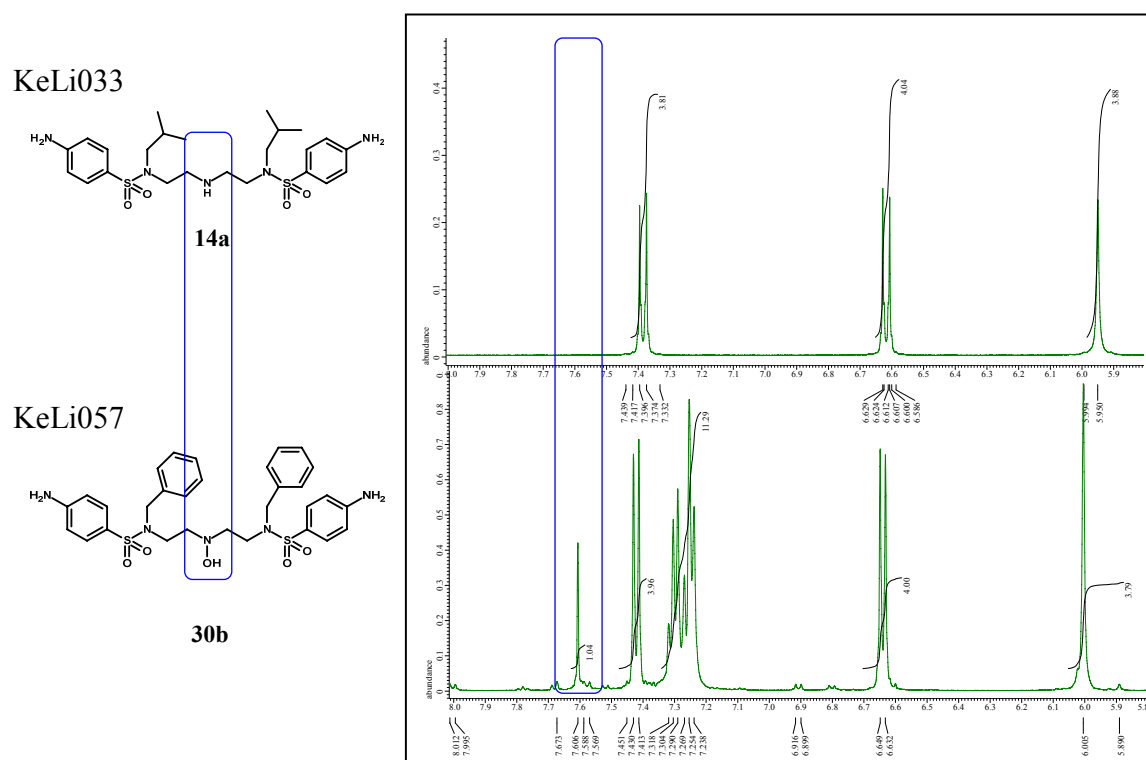


Abbildung 22: Vergleich der ^1H -Spektren des Amins KeLi033 **14a** mit dem Hydroxylamin KeLi057 **30b**, aufgenommen in D_6 -DMSO; gezeigt ist nur der relevante Ausschnitt von 8-5,8 ppm; die entscheidende OH-Resonanz ist in blau markiert.

Beide Spektren wurden in D_6 -DMSO bei 30 °C bei einer Messfrequenz von 400 MHz aufgenommen und sind bis auf zwei Ausnahmen identisch. Zum einen sind im Spektrum der Verbindung **30b** zusätzliche Resonanzen bei 7,3 bis 7,2 ppm zu sehen, die auf die Aromatenprotonen der Benzylgruppe am Sulfonamidstickstoff zurückzuführen

sind. Die Benzylgruppe ist in Verbindung **14a** durch eine *iso*-Butylgruppe ersetzt, weshalb auch keine Resonanzen in diesem Bereich zu erwarten waren. Der zweite augenscheinliche Unterschied liegt in der Resonanz bei 7,6 ppm, die nur im Spektrum der Verbindung **30b** auftaucht. Dabei handelt es sich um die Resonanz des Protons der Hydroxylaminfunktionalität. Im Spektrum der Verbindung **14a** ist diese Resonanz nicht auffindbar, was auf eine Spaltung des Hydroxylamins zum sekundären Amin zurückzuführen ist. Diese Annahme wurde durch die Aufnahme eines Massenspektrums bestätigt.

Die Tetrahydropyran-Gruppe (THP-Gruppe) erwies sich hier als die Schutzgruppe der Wahl. Diese Gruppe ließ sich im letzten Schritt unter milden Bedingungen durch Zugabe des leicht sauren Pyridinium-*p*-toluolsulfonats (PPTS) abspalten und das Hydroxylamin verblieb ohne Zersetzung. Folglich wurde THP als Schutzgruppe für die Hydroxygruppe des Hydroxylamins eingesetzt und für alle Synthesen dieser Art übernommen.

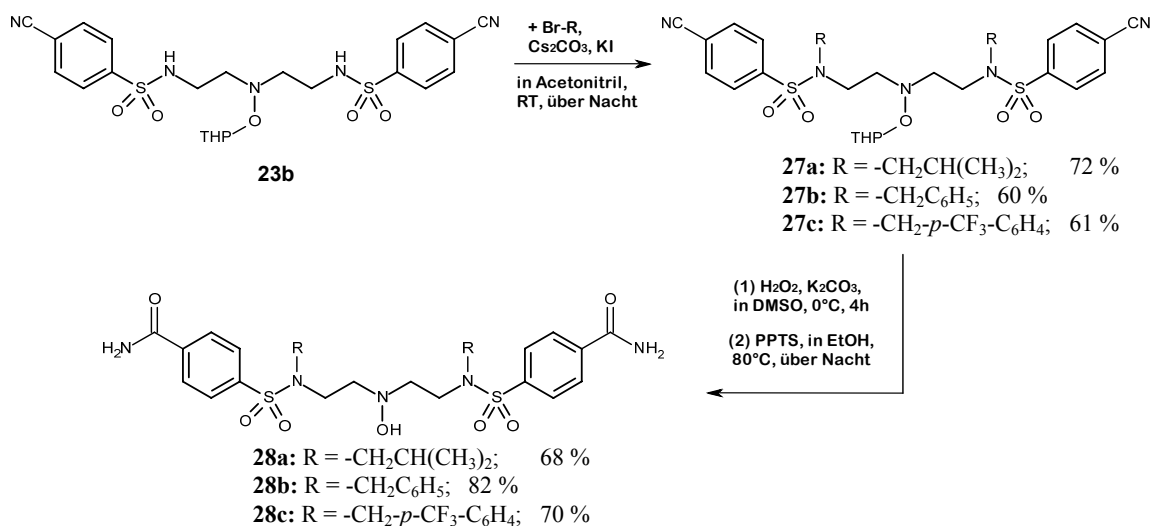


Abbildung 23: Darstellung der Inhibitoren **28a-c** ausgehend von **23b**.

In **Abbildung 23** sind die letzten drei Stufen dargestellt, die zu den Carboxamid-Derivaten **28** führen. Als Elektrophile für die sich anschließende *N*-Alkylierung des Sulfonamids **23** wurden Alkylbromide gewählt, die sich durch hohe Reaktivität und gute Stabilität auszeichnen. Standardmäßig wurde die *N*-Alkylierung mit Cäsiumcarbonat und katalytischen Mengen KI in Acetonitril bei Raumtemperatur durchgeführt. Konnte das Alkylierungsprodukt nach 12 h Reaktionszeit nicht detektiert werden, wurde noch für weitere 12 h unter Rückfluss erhitzt. Die Hydrolyse des Nitrils wurde unter milden Bedingungen mit einer Mischung aus DMSO, Wasserstoffperoxid

und Kaliumcarbonat als Base durchgeführt. [98] Im letzten Schritt erfolgte die Entschützung mittels PPTS unter leicht sauren Bedingungen. [99]

Die Darstellung der Aminverbindungen **30** erfolgte analog. Die Nitrogruppe wurde über einen Hydrierungsschritt zum entsprechenden Amin reduziert. Bei der Wahl des Lösungsmittels für die Hydrierung muss darauf geachtet werden, dass „HPLC-grade“-Methanol verwendet wird. Bei der Verwendung von Methanol in p.a.-Qualität kam es zu unerwünschten Nebenreaktionen, so dass das gewünschte Produkt nicht isoliert werden konnte. Bei der Nebenreaktion handelt es sich vermutlich um eine reduktive Aminierung des aromatischen Amins mit Aceton, dass in kleinen Mengen im Lösungsmittel vorhanden sein könnte. Bei der Verwendung von „HPLC-grade“-Methanol wurde diese Nebenreaktion nicht beobachtet. Auf diese Weise konnten die gewünschten Hydroxylamin-Derivate **30a-d** erhalten werden.

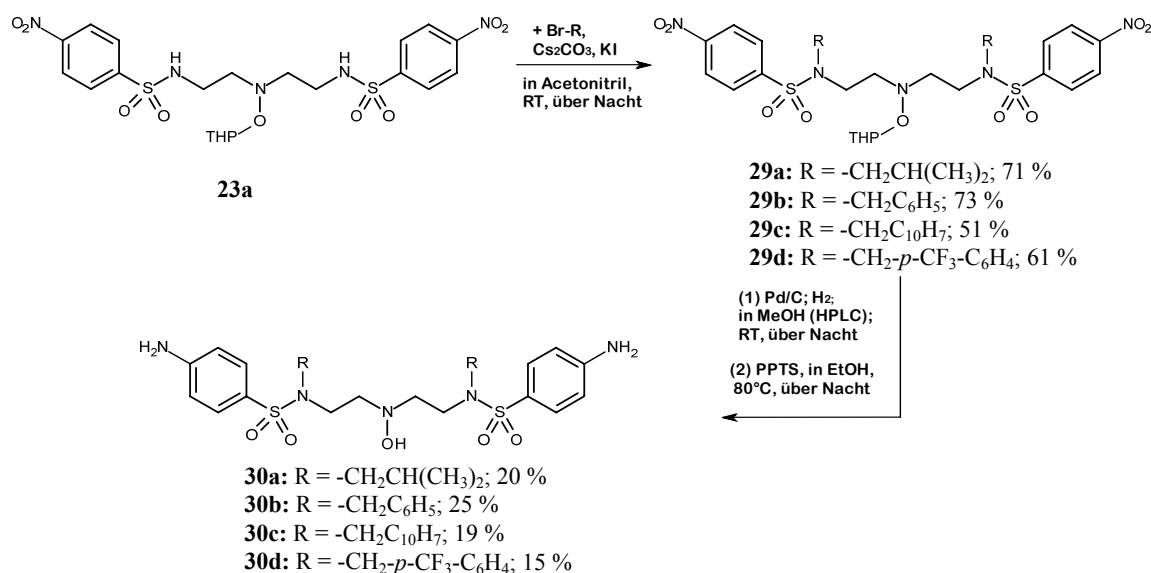


Abbildung 24: Darstellung der Inhibitoren **30a-d** ausgehend von **23a**.

In Analogie zu der beschriebenen Synthese zur Darstellung der Hydroxylamin-Derivate sollten auch die entsprechenden Hydrazin-Derivate **18** hergestellt werden. Die nukleophile Ringöffnung der Aziridine **22a** und **22b** wurde dementsprechend unter den für die Hydroxylamine optimierten Bedingungen, allerdings mit einem Boc-geschützten Hydrazin **31**, durchgeführt (**Abbildung 25**). Die gewünschten Produkte **32** konnten sowohl für das Nitro- als auch für das Nitril-Derivat erhalten werden, allerdings in stark variierenden Ausbeuten.

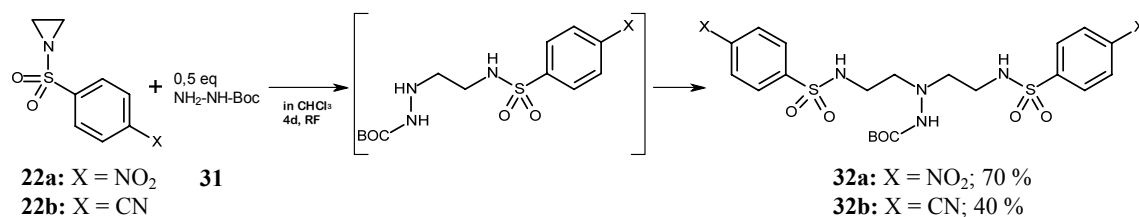


Abbildung 25: Nukleophile Ringöffnung der Aziridine **22a** und **22b** durch das Boc-geschützte Hydrazin **31**.

Im nachfolgenden Schritt konnten die Sulfonamide **32**, wie in **Abbildung 26** dargestellt, durch *N*-Alkylierung mit den entsprechenden Alkylbromiden in guten Ausbeuten substituiert werden.

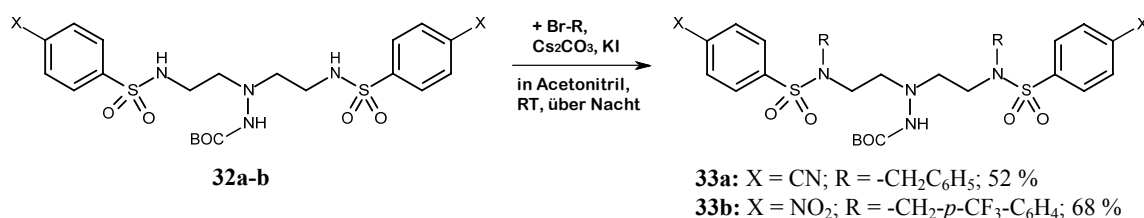


Abbildung 26: *N*-Alkylierung der Sulfonamide mit den entsprechenden Alkylbromiden.

Zur Fertigstellung der gewünschten Hydrazin-Inhibitoren **18** mussten noch zwei weitere Reaktionsschritte durchgeführt werden. Die Nitroverbindungen wurden in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert und zu dem entsprechenden Amin-Derivat **34b** reduziert, während die Nitrilverbindung in das Carboxamid **34a** umgewandelt wurde. Die Ausbeuten dieser Reaktionen sind in **Abbildung 27** dargestellt. Im finalen Schritt musste nur noch die Boc-Schutzgruppe abgespalten werden, was üblicherweise durch Versetzen mit HCl in Diethylether erreicht werden kann. Wider Erwarten konnte jedoch die Schutzgruppe auch nach auf mehrere Tage verlängerter Reaktionszeit sowie zusätzlichem Erwärmen auf 50 °C nicht abgespalten werden. Daher war es leider nicht möglich, die gewünschten Hydrazin-Derivate **18** zu isolieren.

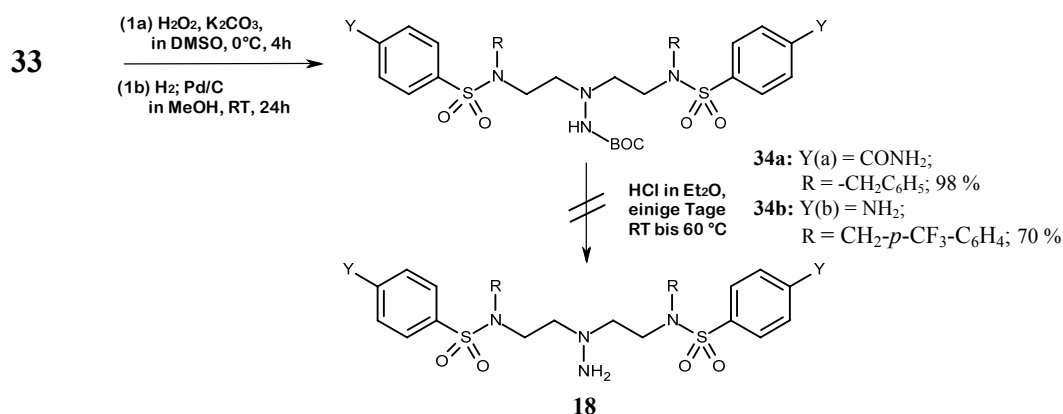


Abbildung 27: Die letzten beiden Schritte in der Reaktionssequenz der Hydrazin-Derivate.

2.2.3 Darstellung der primären Amine aus Serinol

In **Abbildung 28** ist die Retro-Synthese für die Verbindungen **16a-b** dargestellt. Sowohl die lang- als auch die kurzkettigen Derivate können aus der Ausgangsverbindung Serinol **35a** erhalten werden. In beiden Syntheserouten stellen die Diamine **38** und **39** jeweils die Schlüsselverbindung dar. Die anschließenden Alkylierungs-, Reduktions- und Entschützungsreaktionen können analog zu den in Abschnitt 2.2.2 vorgestellten Methoden durchgeführt werden. Für die kurzkettigen Derivate **16b** wird Serinol zunächst in das Boc-geschützte Diazid **37** überführt, bevor es zum entsprechenden Diamin **39** reduziert werden kann. Eine vierstufige Synthese für das Amin **39** aus Serinol wurde 1998 in einer Veröffentlichung von E. Benoist vorgestellt. [100] Allerdings beinhaltet diese Route die Isolation des Diazids **37**, das hoch explosive Eigenschaften besitzt. Aus Sicherheitsgründen wurde deshalb nach einer alternativen Synthese gesucht, die in Abschnitt 2.3 im Detail vorgestellt wird.

Zur Darstellung der langkettigen Derivate **16a** wird das Serinol zuerst in das Boc-geschützte Dinitril **36** überführt, welches nachfolgend zum entsprechenden Diamin **38** reduziert werden kann. Die Verbindung **38** ist in der Literatur nicht bekannt.

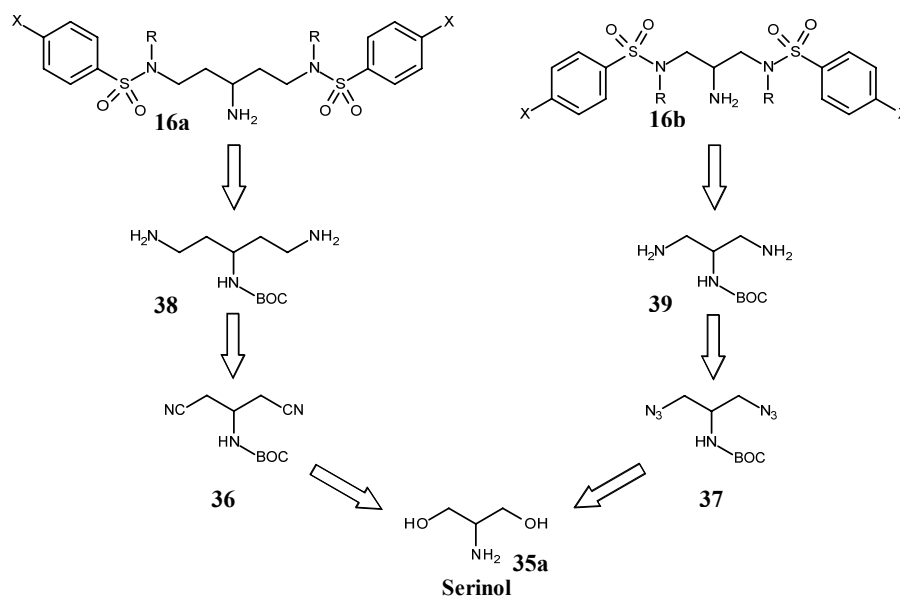


Abbildung 28: Retro-Syntheseplanung für lang- und kurzkettige Amin-Derivate **16a-b** ausgehend von Serinol **35a**.

In **Abbildung 29** ist die Synthese des Dinitrils **36**, die Vorstufe für die Darstellung des Diamins **38**, über eine dreistufige Reaktionsabfolge gezeigt. Ausgehend von Serinol wird zunächst das primäre Amin als Carbamat geschützt. [101] Anschließend erfolgt die Aktivierung des Alkohols durch Umwandlung in das entsprechende Mesylat **40**, [102] gefolgt vom nukleophilen Austausch der Abgangsgruppe durch Cyanid.

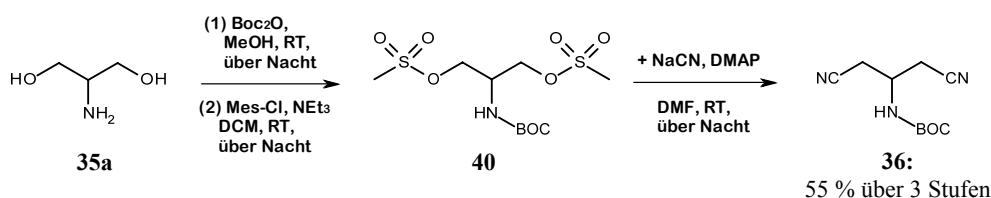


Abbildung 29: Darstellung des Dinitrils **36** aus Serinol **35a**.

Das gewünschte Dinitril **36**, ebenfalls noch unbekannt in der Literatur, konnte in guter Ausbeute von 55 % über drei Stufen aus Serinol erhalten werden. Im nachfolgenden Schritt sollte dieses zum entsprechenden Diamin **38** reduziert werden. In der Literatur ist eine Vielzahl von gängigen Methoden bekannt, wie Nitrile zu den korrespondierenden Aminen reduziert werden können. Beispielsweise ist es möglich, Nitrile mit Lithiumaluminiumhydrid oder Diisobutylaluminiumhydrid zum Amin zu reduzieren. [103] Allerdings konnte mit diesen Reagenzien im vorliegenden Fall keine Umsetzung festgestellt werden. **Tabelle 3** gibt eine Übersicht über die getesteten Methoden. Die Reduktion mit Wasserstoff unter Atmosphärendruck und Palladium als

Katalysator führte auch nach mehreren Tagen zu keiner Umsetzung. In einer Arbeit von Chandler *et al.* von 2010 wird mit 1,3-Dicyano-2-propanol eine zu unserem Dinitril **36** sehr ähnliche Verbindung zum entsprechenden Diamin reduziert. In dieser Reaktion wird das Nitril zusammen mit konzentrierter Salzsäure und Platin(VI)oxid in Ethanol suspendiert und in einem Druckgefäß für zwei Tage bei 10 bar hydriert. [104] Die Anwendbarkeit dieser Methode auf unser Dinitril **36** ist allerdings nicht möglich, da die Boc-Gruppe unter den oben aufgeführten, stark sauren Bedingungen nicht stabil ist. [105] Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, die Reaktion ohne Zusatz der konzentrierten Salzsäure durchzuführen. Das Dinitril **36** wurde für zwei Tage bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar und einer Temperatur von 70 °C zur Reaktion gebracht. [106] Als Lösungsmittel kam sowohl Methanol als auch Ethanol zur Anwendung. In beiden Fällen konnte jedoch keine Umsetzung festgestellt werden. Die Anwesenheit einer Säure scheint folglich essenziell für die Reduktion des Nitrils zu sein. Da aber der Zusatz einer starken Säure aus oben genannten Gründen nicht in Frage kam, musste nach einer Alternative gesucht werden.

In der Literatur wird vereinzelt berichtet, dass bei der Hydrierung von beispielsweise Nitro- und Nitrilfunktionalitäten auch Lösungsmittelgemische von Chloroform in Ethanol eingesetzt werden. [107-109] Dabei übernimmt das Chloroform eine ähnliche Aufgabe wie die in der ersten Methode zugesetzte Säure. Angenommen wird, dass das Chloroform unter den vorliegenden Hydrierungsbedingungen kleine Mengen an Salzsäure generiert, die sofort mit dem gebildeten Amin zum Hydrochlorid reagieren, welches durch Ausfällung das Reaktionsgleichgewicht nach dem Prinzip von Le Chatelier auf die Seite des Amins verschiebt. [109] Die Mengen an HCl reichen aber nicht aus, um die Boc-Schutzgruppe der zu reduzierenden Verbindung abzuspalten. Auf diese Weise konnte das Dinitril **36**, gelöst in einem Gemisch aus Ethanol und Chloroform, bei einer Temperatur von 70 °C und einem Wasserstoffdruck von 5 bar erfolgreich zum Diamin **38** reduziert werden.

	<chem>NC(CCN(C)C)C#N</chem> $\xrightarrow{\text{Welche Methode?}}$ <chem>NCCCN(C)CCN</chem> 36 38				
Methode	H ₂ ; Pd/C RT	LiAlH ₄ (fest & flüssig)	Dibal-H	H ₂ ; PtO ₂ 5 bar, 70 °C in MeOH oder EtOH	H ₂ ; PtO ₂ 5 bar, 70 °C 10 % CHCl ₃ in EtOH
gewünschtes Produkt in %	x	x	x	x	✓ ca. 60 %

Tabelle 3: Die aufgeführten Methoden wurden in der Reaktion von Verbindung **36** zum Diamin **38** getestet; das erhaltene Diamin **38** wurde ohne weitere Aufarbeitung in nächsten Schritt weiter umgesetzt.

Diese Methode wurde dann, wie in **Abbildung 30** gezeigt, in der Synthese der langkettigen Amine eingesetzt. Aufgrund der schwierigen Aufarbeitung wurde das Diamin **38** nicht isoliert, sondern im nächsten Schritt direkt zum Sulfonamid umgesetzt. Die Ausbeute dieser beiden Stufen beläuft sich auf ungefähr 40-50 %. Die weiteren Syntheseschritte bis zum fertigen Inhibitor sind die *N*-Alkylierung des Sulfonamids mit verschiedenen Alkylbromiden, die Hydrolyse des aromatischen Nitrils zum Carboxamid sowie im letzten Schritt die Abspaltung der Schutzgruppe.

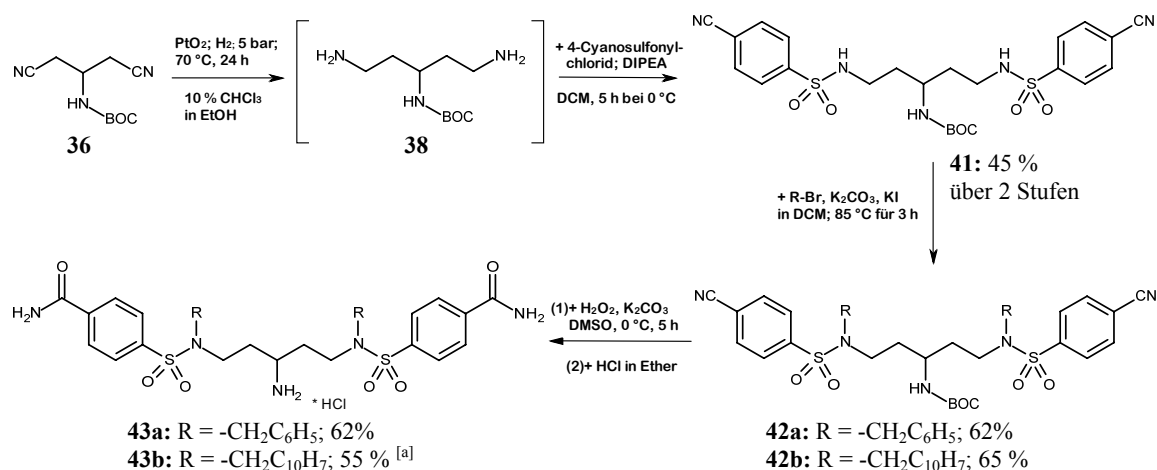


Abbildung 30: Derivatisierung der langkettigen, primären Amine über fünf Stufen ausgehend vom Dinitril **36**; [a] als freies Amin isoliert.

Die Darstellung der kurzkettigen Derivate **16b** sollte auf analogem Wege erfolgen. Auch hier stellte die Synthese des Diamins **39** eine synthetische Herausforderung dar und zwar nicht aufgrund der fehlenden Dokumentation zur Darstellung dieses Moleküls in der Literatur, sondern wegen der hohen Explosivität der Zwischenstufe des Diazids **37**, welches in der bereits publizierten Synthese als Intermediat isoliert werden

musste. [100] In **Abbildung 31** ist die Reaktionsabfolge dargestellt. Die beiden Hydroxygruppen werden zuerst als Mesylate aktiviert und anschließend in einer nukleophilen Substitutionsreaktion in das entsprechende Diazid transformiert, welches säulenchromatographisch aufgereinigt und isoliert werden muss. Im letzten Schritt wird das Diazid zum Diamin reduziert.

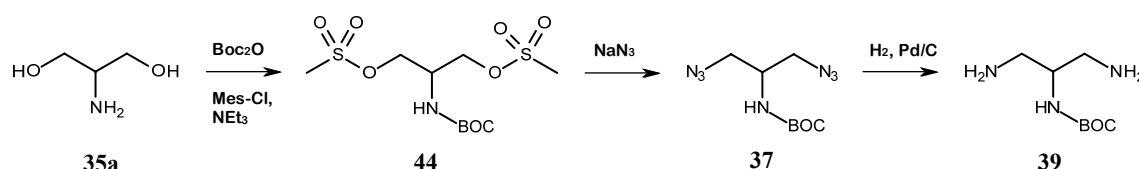


Abbildung 31: Oft verwendete Route zur Herstellung von Aminen aus den entsprechenden Alkoholen; zuerst erfolgt die Aktivierung des Alkohols, im Anschluss findet eine nukleophile Substitution zum Azid statt und zuletzt wird das Amin durch Reduktion mit Wasserstoff erhalten. [100]

Azide besitzen generell ein gewisses Explosionspotential. Das Maß der Explosivität eines organischen Azids kann abgeschätzt werden und ist abhängig von der relativen Anzahl der Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlenstoffatome. Dabei werden zwei Hauptkriterien der Einstufung zugrunde gelegt. Eine Azidverbindung gilt als nicht explosiv, wenn die Anzahl der Stickstoffatome kleiner ist als die der Kohlenstoffatome und das Ergebnis von **Formel 1** einen Wert größer drei ergibt. [110]

Organische Azide sind nicht explosiv, wenn

$$[C_Atome] > [N_Atome] \text{ und}$$

$$\frac{[C_Atome] + [O_Atome]}{[N_Atome]} > 3 \quad \text{Formel 1}$$

erfüllt ist. Für das Diazid **37** ist die Anzahl der C-Atome um eins höher als die Anzahl der N-Atome, jedoch liegt der Quotient hier mit

$$\frac{[C_Atome] + [O_Atome]}{[N_Atome]} = \frac{8 + 2}{7} = 1,43$$

beträchtlich unter dem empfohlenen Richtwert von 3. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Diazid **37** um eine explosive Verbindung handelt, deren Isolierung vermieden werden sollte. Die literaturbekannte Route zur Darstellung des Diamins **39** im Großmaßstab anzuwenden, ist aus sicherheitstechnischen Gründen nicht zu empfehlen. Folglich musste eine neue, sicherere Variante entwickelt werden, das

Diamin **39** in größeren Mengen zu synthetisieren. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Entwicklung einer neuartigen auch auf andere Alkohole anwendbaren „Eintopf“-Methode zur Darstellung der entsprechenden Amine. Die Methodenentwicklung wird in Abschnitt 2.3 im Detail beschrieben. Das Diamin **39** konnte durch die neue Methode ohne Isolierung des Diazids **37**, ausgehend vom Diol **35b** in sehr guter Ausbeute erhalten werden.

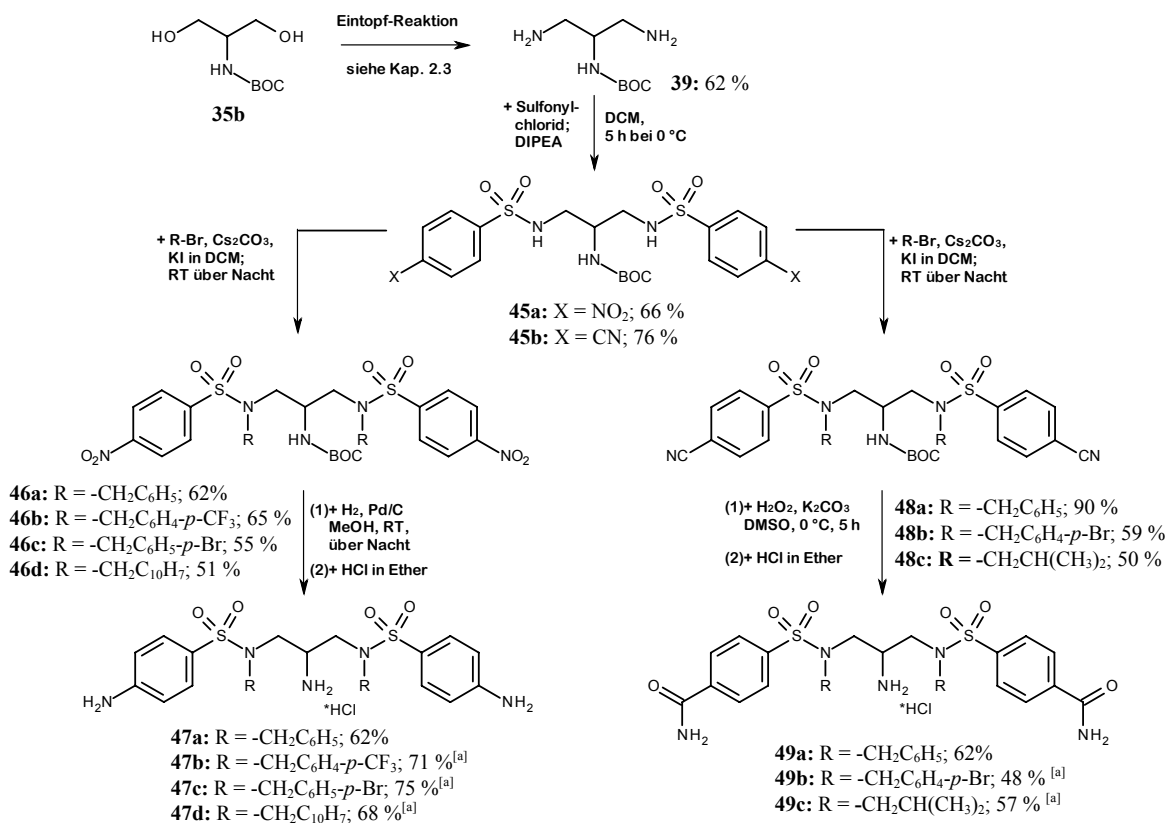


Abbildung 32: Darstellung der kurzkettigen Amin-Derivate **47** und **49** über vier Stufen aus dem Diamin **39**; [a] als freies Amin isoliert.

Das jetzt auch in großen Mengen zugängliche Amin **39** wurde, wie in **Abbildung 32** dargestellt, zu den gewünschten Zielverbindungen umgesetzt. Analog zu den langkettigen Derivaten erfolgte die Synthese aus dem Amin über zwei Alkylierungsschritte, die Reduktion der Nitrogruppe bzw. Hydrolyse des Nitrils und die abschließende Abspaltung der Schutzgruppe. Auf diese Weise konnten die abgebildeten Verbindungen **47a-d** und **49a-c** erhalten werden.

2.3 Einstufensynthese zur Herstellung von Aminen aus Alkoholen

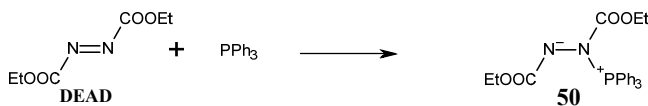
Wie schon im vorangegangenen Abschnitt kurz erwähnt, war die Darstellung des Diamins **39**, welches für die Synthese der kurzkettigen Amine benötigt wurde, durch die literaturbekannte Methode im größeren Maßstab nicht praktikabel. Die gängigsten Prozeduren zur Darstellung von Diaminen unter Verwendung der korrespondierenden Diole als Ausgangsverbindungen beruhen auf der folgenden dreistufigen Reaktionssequenz:

Im ersten Schritt werden die Hydroxygruppen durch Überführung in die jeweiligen Sulfonsäureester für den nukleophilen Angriff des Azid-Ions aktiviert. Als Azid-Quellen dienen häufig anorganische Azide wie beispielsweise Natriumazid. Der Austausch der Abgangsgruppe gegen das Azid erfordert allerdings oft erhöhte Temperaturen sowie längere Reaktionszeiten. Das isolierte Diazid wird im letzten Schritt durch Hydrierung zum entsprechenden Diamin reduziert. [100, 102, 111, 112]

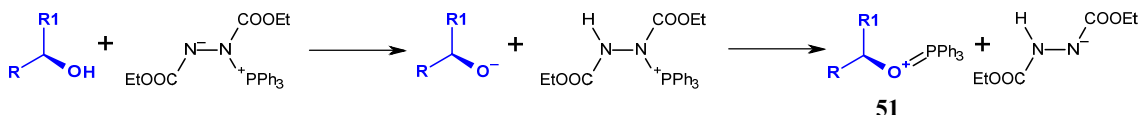
Die Isolierung des Diazids **37** im großen Maßstab stellt aufgrund des hohen Explosionspotentials ein nicht berechenbares Risiko dar (siehe S. 44) und sollte möglichst vermieden werden. Aus diesem sicherheitsrelevanten Grund wurde nach einer neuen Methode für die Darstellung des Diamins **39** gesucht. Für die Darstellung von Aminen aus Alkoholen ist eine Methode unter Mitsunobu-Bedingungen mit anschließender Reduktion bekannt. [113] In diesem Fall ist die Isolierung des Azids nicht notwendig. Allerdings wird als Azid-Quelle die leicht flüchtige, hoch giftige und explosive Stickstoffwasserstoffsäure verwendet. Diese ist nicht kommerziell erhältlich und muss aus Natriumazid und konzentrierter Schwefelsäure hergestellt und in den Reaktionsansatz eingeleitet werden. [114] Damit stellte diese Methode auch keine Alternative für die Synthese des Diamins dar. Auf der Suche nach einer alternativen Azid-Quelle wurde schließlich Diphenylphosphorylazid (DPPA) gefunden, welches ein relativ stabiles, leicht zu handhabendes und weniger toxisches Reagenz repräsentiert. [115] DPPA wird erfolgreich in der Umwandlung von Alkoholen zu Aziden [116] sowie von Carbonsäuren zu Carbonsäureaziden, das Intermediat einer Curtius-Umlagerung [117] eingesetzt. Damit kann DPPA als Azid-Quelle in einer mitsunobuartigen Reaktion eingesetzt werden, um das Azid aus einem Alkohol herzustellen. Um nun in unserem Fall die Isolierung des Diazids **37** zu vermeiden, sollte das intermediär entstandene Diazid ohne Aufreinigung mit einem Überschuss an Triphenylphosphin (TPP), welches ebenfalls für die Mitsunobu-Reaktion benötigt wird, in einer sich anschließenden Staudinger-Reaktion zum Amin reduziert werden können.

Damit wäre die Darstellung des Amins aus dem entsprechenden Alkohol in einer Einstufensynthese möglich und zusätzlich die Isolierung des explosiven Diazids nicht mehr nötig.

1. Darstellung des Betain-Komplexes:



2. Aktivierung des Alkohols:



3. Nukleophile Substitution unter Inversion:

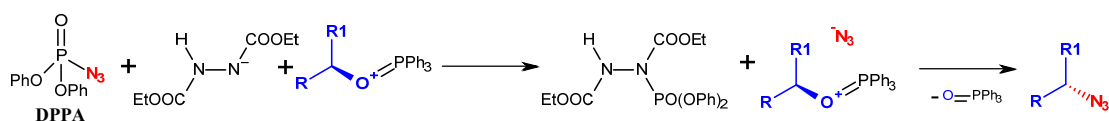


Abbildung 33: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion mit DPPA vom Alkohol zum entsprechenden Azid unter Inversion des Stereozentrums.

In **Abbildung 33** ist der postulierte Mechanismus der mitsunobuartigen Reaktion zur Transformation eines Alkohols in das korrespondierende Azid unter Inversion des Stereozentrums dargestellt. Im ersten Schritt bildet sich aus TPP und DEAD der Betain-Komplex **50** aus. Dieser deprotoniert den zugesetzten Alkohol, der anschließend mit dem Triphenylphosphonium-Kation zu Verbindung **51** abreagiert. Triphenylphosphinoxid ist eine gute Abgangsgruppe, die durch den nukleophilen Angriff des aus dem Reagenz DPPA generierten Azid-Anion (N₃⁻) unter Inversion substituiert wird. Auf diese Weise kann das invertierte Azid aus einem Alkohol erhalten werden. [116] Durch die Anwesenheit eines Überschusses an TPP wird das intermediär entstandene Azid direkt in einer Staudinger-Reaktion, deren Mechanismus in **Abbildung 34** dargestellt ist, zum entsprechenden Amin reduziert.

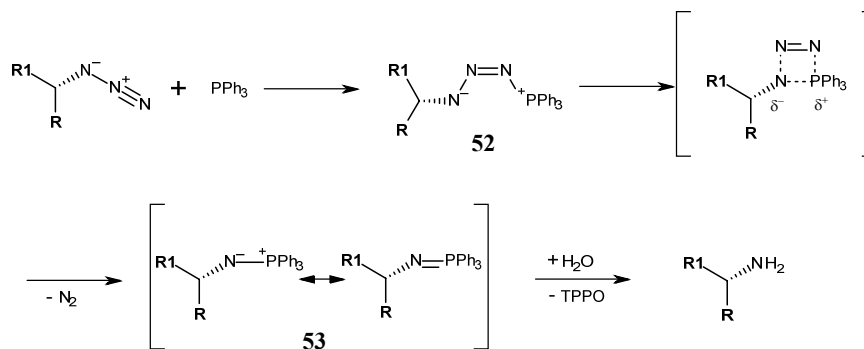


Abbildung 34: Mechanismus der Staudinger-Reduktion eines Azids zum Amin.

Mittels der Staudinger-Reduktion können Azide unter milden Bedingungen reduziert werden. [118, 119] Im ersten Schritt bildet das TPP zusammen mit dem Azid ein *cis*-konfiguriertes Phosphazid **52**, das unter Abspaltung von N₂ in einer konzertierten Reaktion zum entsprechenden Phosphazen bzw. Phosphinimin **53** zerfällt. Die abschließende Hydrolyse setzt das gewünschte Amin sowie TPPO als Nebenprodukt frei.

In **Abbildung 35** sind die Bedingungen für diese Reaktion dargestellt. Zuerst wird der Komplex aus TPP und DEAD bei -15 °C gebildet. Anschließend wird der Alkohol zugegeben und nach 30 Minuten das DPPA langsam zugetropft. Die Temperatur darf dabei nicht über -10 °C ansteigen. Innerhalb der nächsten 12 h wird die Reaktion langsam auf RT aufgewärmt. Nach 5 h bei RT wird der Ansatz mit Ammoniak versetzt und bei RT noch weitere 12 h gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand ohne Aufarbeitung über eine Säule mit Aminphase aufgereinigt.

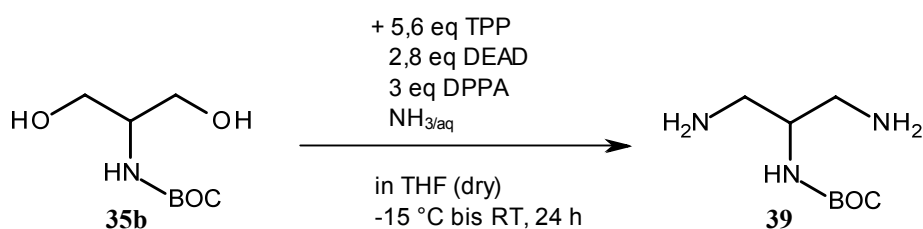


Abbildung 35: Optimierte Reaktionsbedingungen für die einstufige Umwandlung des Diols **35b** zum Diamin **39** mittels einer Mitsunobu-Staudinger Reaktion.

Entscheidend für den Erfolg der Reaktion nach dieser Methode ist die Temperatur. Diese muss, wie durch zahlreiche Experimente herausgefunden wurde, während der gesamten Reaktionszeit gut kontrolliert werden und für die ersten 5-7 h unterhalb von -10 °C liegen. Wärmt die Reaktion zu früh und zu schnell auf, resultiert dies in schlechten Ausbeuten. Vermutlich reagiert bei zu hohen Temperaturen zu Beginn der Reaktion das DPPA mit dem Triphenylphosphin und zerstört so das Reagenz, bevor dies mit dem Alkohol zum Azid reagieren kann. Durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, in nur einem Schritt aus einem Diol das korrespondierende Diamin herzustellen. Um die Anwendbarkeit dieser neuen Methode zu überprüfen, wurden weitere, in unserer Arbeitsgruppe als Synthone verwendete Diole getestet, um auch in diesen Fällen die riskante Isolierung der Diazide zu umgehen. In **Tabelle 4** sind die Diole und die isolierten Produkte mit Ausbeuten aufgeführt.

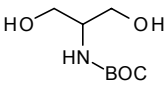
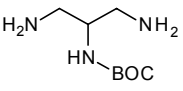
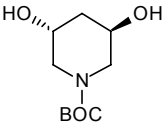
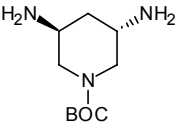
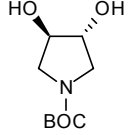
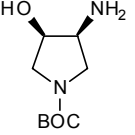
Diol	Produkt	Ausbeute	Ausbeute über klassische Route
 35b	 39	62 %	62 % [100]
 55	 56	55 %	nicht bekannt
 57	 58	63 %	?

Tabelle 4: Dargestellt sind die Dirole, die mit der neu entwickelten Methode getestet wurden, die entstandenen Produkte sowie die zugehörigen Ausbeuten.

Vergleicht man die Ausbeute für Verbindung **39** der neuen Methode mit der konventionellen Methode über drei Schritte, erhält man für beide Varianten Ausbeuten von 62 %. Damit liefert die neue Methode zwar keine besseren Ausbeuten, aber eine einfachere, schnellere und ungefährlichere Art, das Diamin herzustellen. Auch die Umsetzung des zyklischen 1,3-Diols **55** unter den beschriebenen Bedingungen resultierte im entsprechenden Diamin **56**. Die Ausbeute war zwar mit 55 % etwas schlechter im Vergleich zum offenkettigen 1,3-Diol, dies ist aber durch die größere sterische Hinderung der sekundären Alkoholfunktionalitäten auch zu erwarten. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang die Umsetzung des 3,4-Dihydroxypyrrolidins **57**, eines vicinalen Diols, das in der Arbeit von Nina Klee von besonderem Interesse ist, zum Diamin unter den oben aufgeführten Bedingungen nicht beobachtet werden. Dafür konnte jedoch selektiv der Aminoalkohol **58** in guter Ausbeute isoliert werden. Die Gründe für diesen andersartigen Reaktionsverlauf sind wahrscheinlich durch den sterischen Anspruch des Rings und die räumliche Nähe der vicinalen Hydroxygruppen zueinander zu erklären.

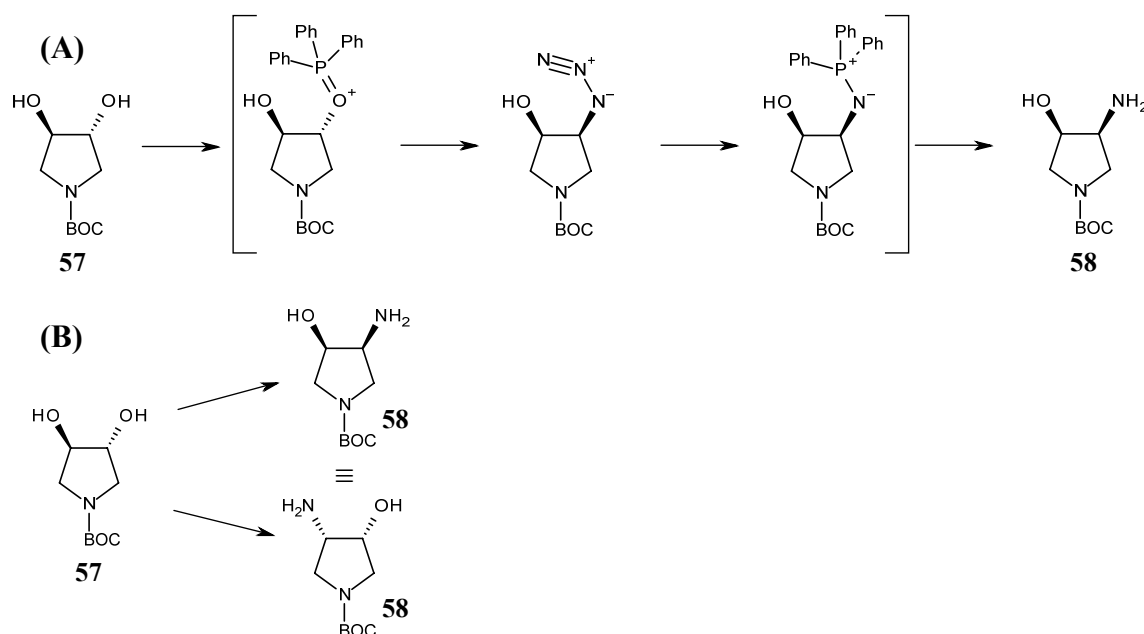


Abbildung 36: (A) Reaktionssequenz des 3,4-Dihydroxypyrrolidins **57** in der Mitsunobu-Staudinger Variante zur Darstellung des Monoamin Derivats **58**; (B) Produkt **58** entsteht unabhängig davon, an welcher der beiden Alkoholgruppen die Reaktion zum Amin durchgeführt wird.

In **Abbildung 36 (A)** sind die wichtigsten Zwischenstufen dargestellt, die das 3,4-Dihydroxypyrrolidin **57** während der Reaktionsabfolge zum Monoamin durchläuft. Es wird deutlich, dass während der Reaktion bis zur Hydrolyse die zweite Hydroxyfunktionalität aufgrund der sterisch anspruchsvollen Reste am reagierenden Alkohol vor einer weiteren Reaktion abgeschirmt wird. Wie in **Abbildung 36 (B)** veranschaulicht, ist das Produkt der Mitsunobu-Staudinger-Reaktion immer identisch, unabhängig davon, welcher der Alkohole zur Reaktion gebracht wird. Der oben erwähnte sterische Anspruch ist beispielsweise bei dem Serinol-Derivat **35b** nicht gegeben. Erstens sind die beiden Hydroxyfunktionalitäten räumlich weiter voneinander getrennt und zweites durch frei drehbare Bindungen sehr flexibel. Aus diesem Grund ist hier die Reaktion beider Alkohole zum Diamin **39** möglich. Konsequenterweise stellt diese Reaktionssequenz somit eine vielversprechende Methodik zur stereoselektiven Desymmetrisierung sterisch gehinderter vicinaler Diole dar. Eine solche Reaktion ist häufig nur in mäßigen Ausbeuten durch Monoschutzung einer der beiden Hydroxyfunktionalitäten, einer weiterer Umsetzung des ungeschützten Alkohols zum Amin und einer dadurch notwendigen Abspaltung der Schutzgruppe möglich.

Diese neuartige Mitsunobu-Staudinger Variante mit DPPA als Azid-Quelle erlaubt es folglich, in einem Schritt aus 1,3-Diolen die entsprechenden Diamine und aus sterisch anspruchsvollen 1,2-Diolen Aminoalkohole herzustellen. Natürlich kann diese Methode

auch für die Umwandlung einfacher Alkohole in das entsprechende Amin eingesetzt werden. In der Synthese der Piperidin-Derivate (Abschnitt 3.2.2) wird die hier entwickelte Methode ebenfalls angewendet und resultiert dort sowohl in einer deutlichen Verbesserung der Ausbeute im Vergleich zur alternativen Route als auch in einer erheblichen Zeitersparnis aufgrund der geringeren Anzahl an Synthesestufen.

2.4 Rationales Design der zyklischen Harnstoffe

2.4.1 Docking

Bei der Darstellung der kurzkettigen primären Amin-Liganden entwickelte sich die Idee, dass eine Zyklisierung des Diamins **39** zum Harnstoffderivat **59** aufgrund der Präorganisation des Inhibitors positive Beiträge zur Affinität zum Zielenzym liefern könnte.

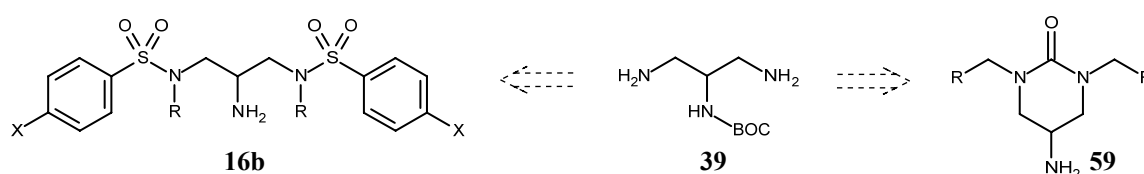


Abbildung 37: Mögliche Zyklisierung des Diamins **39**, einer Zwischenstufe zur Darstellung der offenkettigen primären Amine, zum Harnstoffderivat **59**.

Folglich wurde ein Dockingexperiment mit dem Programm FlexX mit der Kristallstruktur 1HWR (zyklischer Harnstoff) und einer kleinen Molekülbibliothek durchgeführt. In der verwendeten Kristallstruktur ist das Wassermolekül in der Flapregion durch den Liganden XK216 verdrängt. [120] Somit wurde das Wassermolekül im Dockingexperiment nicht berücksichtigt. Die katalytischen Aspartate 25 und 25' wurden für das Dockingexperiment deprotoniert, um optimale Wasserstoffbrücken zum geladenen primären Amin aufbauen zu können. Die Dockinglösungen wurden mit MiniMuDS [86] minimiert und mit DrugScore (DSX_pdb) [87] neu bewertet. Der generierte Bindungsmodus sowie die Darstellung der guten und schlechten Potenziale, die durch die DrugScore-Bewertung erhalten wurden, sind in **Abbildung 38** dargestellt. Die protonierte exozyklische Aminfunktionalität kommt genau zwischen den beiden katalytischen Aspartaten zu liegen und baut mit diesen ein Wasserstoffbrückennetzwerk auf. Das Sauerstoffatom des Harnstoffmotivs ist in der Lage, beide Rückgrat-NHs der Isoleucine 50 und 50' direkt zu adressieren. In **Abbildung 38 (B)** ist die Überlagerung des DMP-Liganden mit der Dockinglösung des zyklischen Harnstoffs aus 1HWR dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Carbonylgruppen der beiden Liganden, die die Interaktion zur Flapregion gewährleisten sollen, exakt auf der gleichen Position platziert sind. Auch die primäre Aminfunktionalität wird von FlexX genau zwischen die beiden

Hydroxygruppen des vicinalen Diols des DMP-Liganden positioniert. Die Ausrichtung der Substituenten am Ring ermöglicht eine gute Besetzung von zwei der vier Spezifitätstaschen, was in der **Abbildung 38 (B)** deutlich wird. Anhand dieser Dockinglösung scheint es möglich, die Interaktionen mit den Aspartaten und auch zur Flapregion durch die zyklischen Harnstoffe ausbilden zu können.

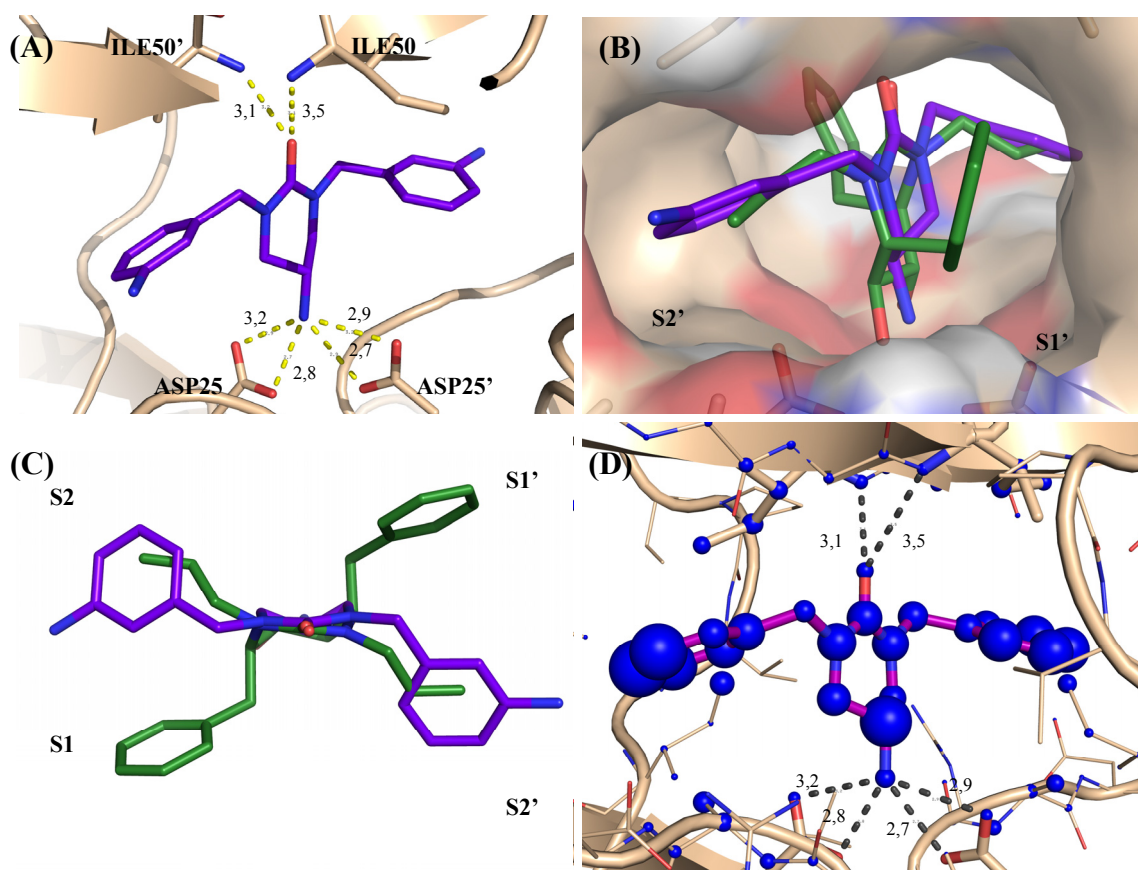


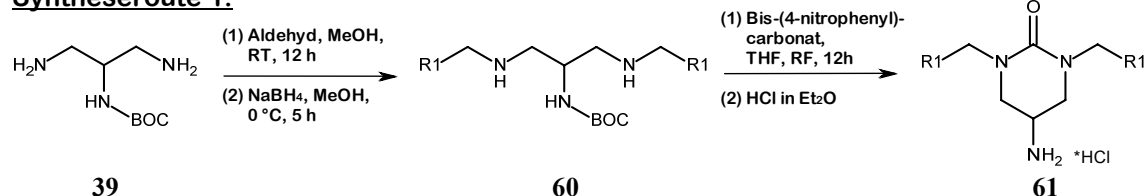
Abbildung 38: Mittels FlexX generierter Bindungsmodus eines zyklischen Harnstoffs im Komplex mit der HIV-Protease. (A): Dargestellt sind die Hauptinteraktionen des Liganden mit den katalytischen Aspartaten sowie den Isoleucinen der Flapregion; (B) und (C): Überlagerung der Dockinglösung mit der Kristallstruktur des DMP-Liganden; violett: Dockinglösung; grün: DMP-Ligand aus Kristallstruktur 1HWR; (D): Bewertung der Dockinglösung des Benzyl-Derivats mit DrugScore; gute Potenziale werden mit blauen und schlechte mit roten Kugeln visualisiert; Abstände sind in Å angegeben.

Die zwei Substituenten sind in der Lage, in die Spezifitätstaschen hineinzuragen. Dabei werden, wie in der dargestellten Abbildung deutlich wird, die S2- und S2'-Tasche adressiert. Es scheint aber auch möglich, jeweils die S1- und S1'-Tasche zu besetzen. Für die Substituenten der Amidstickstoffe wurden daher verschiedene Substituenten ausgewählt, die entweder hydrophoben Charakter besitzen oder auch polare Gruppen aufweisen.

2.4.2 Syntheseplanung und Durchführung

Zur Darstellung der zyklischen Harnstoffe **61** und **63** diente als Startpunkt das Diamin **39**. Dieses kann auf zwei unterschiedlichen Wegen in die gewünschten Zielverbindungen umgewandelt werden. Die beiden möglichen Syntheserouten inklusive der Reaktionsbedingungen sind in **Abbildung 39** dargestellt. Im ersten Schritt der ersten Methode wurde eine reduktive Aminierung des Diamins **39** mit diversen Aldehyden durchgeführt, um das zweifach alkylierte Amin **60** zu erhalten. Anschließend wurde das sekundäre Amin unter Verwendung von Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat cyclisiert und im finalen Schritt mittels HCl in Diethylether die Boc-Schutzgruppe abgespalten. Auf diese Weise konnten die gewünschten Verbindungen mit den Substituenten R1 erhalten werden, die in **Tabelle 5** mit den resultierenden Gesamtausbeuten über vier Stufen aufgelistet sind.

Syntheseroute 1:



Syntheseroute 2:

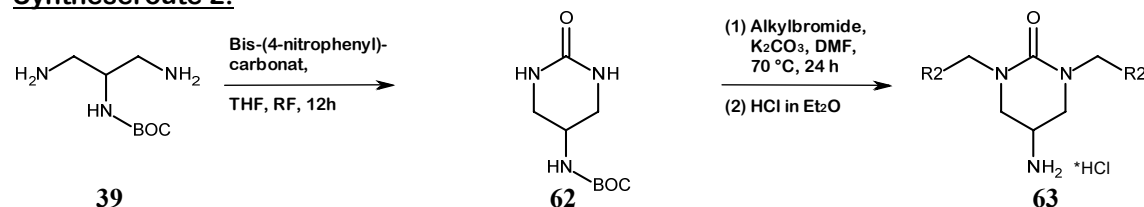
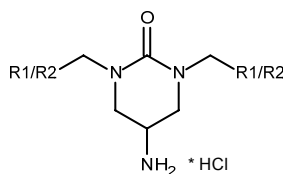


Abbildung 39: Zwei unterschiedliche Syntheserouten zur Darstellung der zyklischen Harnstoffe; R1 und R2 stellen die hydrophoben Substituenten dar.

Da die reduktive Aminierung nicht mit allen gewünschten Aldehyden durchgeführt werden konnte, musste eine zweite Syntheseroute ausgearbeitet werden, die auch die Darstellung dieser Inhibitoren ermöglichte. Die zweite Synthesesequenz startete mit der Zyklisierung des Diamins **39** unter Verwendung von Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat zum unsubstituierten zyklischen Harnstoff **62**. Im nachfolgenden Schritt wurden die Stickstoffatome des Harnstoffmotivs mit diversen Alkylbromiden alkyliert. [121] Abschließend wurde die Boc-Schutzgruppe auf die übliche Weise abgespalten und das gewünschte Produkt mit den Substituenten R2 gewonnen. Die über diese Route zugänglichen Verbindungen sowie die Gesamtausbeuten über drei Stufen sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.



	R1	Gesamt- ausbeute		R2	Gesamt- ausbeute
61a		37 %	63a		38 %
61b		36 % ^[a]	63b		32 %
61c		33 %			
61d		28 %			

Tabelle 5: Strukturen der dargestellten zyklischen Harnstoffe inklusive der Gesamtausbeuten ausgehend vom Diamin **39**, Substituenten R1: zugänglich über die Syntheseroute 1 und Substituenten R2: zugänglich über Syntheseroute 2, [a] als freies Amin isoliert.

Die angegebenen Verbindungen konnten in guten bis zufriedenstellenden Ausbeuten gewonnen werden und wurden anschließend in kompetitiven Bindungsassays auf die HIV-Protease und auf Endothiapepsin getestet.

2.5 Struktur-Aktivitäts-Bestimmung

2.5.1 Einsatz von Detergenzien in fluoreszenzbasierten, kompetitiven Bindungsassays

Der erste synthetisierte Inhibitor, das Hydroxylamin **30b**, wurde im fluoreszenzbasierten, kompetitiven Bindungsassay auf die Affinität gegenüber der HIV-Protease getestet. BSA (Bovines Serumalbumin) wurde als Detergenz in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt, um eine mögliche Aggregation von Protein- bzw. Inhibitormolekülen zu verhindern, die aufgrund dieser Tatsache zu falschen Messergebnissen hätte führen können. Unter diesen Bedingungen war jedoch keine Inhibition der HIV-Protease durch das Hydroxylamin feststellbar. In einem zweiten Experiment wurde dann **30b** im Bindungsassay ohne Detergenz vermessen. Interessanterweise war es in diesem Fall möglich, einen IC₅₀-Wert von 2 µM für das Hydroxylamin **30b** zu bestimmen. Diese Beobachtung konnte nach unseren Erkenntnissen durch zwei unterschiedliche Ursachen hervorgerufen worden sein. Da BSA selbst ein Transportprotein ist, war es denkbar, dass getestete Substanzen mit BSA anstatt mit dem jeweiligen Zielenzym interagieren und es dadurch zu falsch negativen Ergebnissen kommen könnte. Es war aber ebenfalls möglich, dass es sich bei **30b**, das in Anwesenheit von Detergenzien seine Inhibitionskraft verliert, um einen unspezifischen Binder handelte.

Shoichet *et al.* untersuchten erstmals das Phänomen der unspezifischen Inhibition („*promiscuous inhibition*“) eines Enzyms, die durch Aggregationsbildung der Inhibitormoleküle auftreten kann, im Detail. Die Ausbildung von Aggregaten der Inhibitormoleküle hat zur Folge, dass Substanzen als Inhibitoren für ein Enzym vorgetäuscht werden, obwohl sie in der Realität keine kompetitiven Binder sind. Substanzen, die die Inhibition durch Zusammenlagerung zu Aggregaten imitieren können, zeigen kaum Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, sind unspezifisch, nicht *drug-like* und absolut unerwünscht in der strukturbasierten Wirkstoffforschung. [122] Die gesicherte Identifizierung dieser Substanzen und die Verhinderung von unspezifischer Inhibition sind daher von großer Bedeutung. Shoichet *et al.* empfehlen den Einsatz von Detergenzien im Enzym-Assay, um die Aggregation zu unterbinden und falsch positive Treffer von wahren Inhibitoren unterscheiden zu können. Die Verwendung von Triton X-100 wird als ein herkömmliches und oft verwendetes Detergenz in Konzentrationen von 0,1 % - 0,01 % (hier: Gew.-%) vorgeschlagen. [123, 124] Aufgrund dieser

Erkenntnisse und um herauszufinden, welche Art Inhibition durch **30b** hervorgerufen wird, wurde Triton X-100 im HIV-Assay mit einer Endkonzentration von 0,1 % eingesetzt. Unter diesen Bedingungen zeigte das Hydroxylamin **30b** nur eine sehr schwache Inhibition. Es war jedoch, wie oben erwähnt, in Abwesenheit von Detergenzien in signifikantem Maße affin. Der Arbeitshypothese von Shoichet *et al.* folgend legt dieses Ergebnis eine Klassifizierung des Hydroxylamins als einen unspezifischen Binder nahe.

Allerdings zeigten sich in späteren Messungen anderer Inhibitor Klassen unter Verwendung von Triton X-100 in einer Konzentration über 0,1 % Unstimmigkeiten in den Struktur-Wirkungsbeziehungen innerhalb einer Verbindungserie. Als Kontrollexperiment wurden daher früher in unserer Arbeitsgruppe dargestellte Inhibitoren unter Verwendung von Triton X-100 (0,1 %) erneut vermessen. Dabei wurde überraschenderweise festgestellt, dass die IC₅₀-Werte, die von Jark Böttcher unter BSA-Zusatz (1 mg/ml) gemessen worden waren, nicht reproduziert werden konnten. In Zusammenarbeit mit Nina Klee und Stefanie Dörr wurde nach der Ursache für dieses Phänomen gesucht.

Der IC₅₀-Wert von Inhibitor AB111, der mit Triton X-100 (0,1 %) als Detergenz bestimmt wurde, betrug 9 µM, wohingegen unter Zusatz von BSA (1 mg/ml) ein Wert von 140 nM bestimmt worden war, was eine Verschlechterung der Hemmwirkung um den Faktor 60 in Anwesenheit von Triton X-100 bedeutete. Dieses Ergebnis hätte auf den ersten Blick durch eine unspezifische Inhibition von AB111 erklärt werden können. Diese Erklärung erschien allerdings nicht plausibel, da AB111 aus einer Serie von Inhibitoren stammt, die eine in sich schlüssige Struktur-Wirkungsbeziehung zeigten. Es konnten zudem mehrere Kristallstrukturen dieser Verbindungsklasse gelöst werden, die den Bindungsmodus bestätigten. BSA ist außerdem ebenfalls in der Lage, die Aggregation von Inhibitormolekülen zu unterbinden und folglich eine unspezifische Inhibition zu verhindern. Damit könnte die beobachtete Affinitätsabnahme durch die Verwendung von Triton X-100 nicht auf die Auflösung von Aggregaten von unspezifischen Bindern zurückgeführt werden. Chung *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die *E. coli* AmpC β -Lactamase-Enzymaktivität im Assay in Anwesenheit von Triton X-100 signifikant und konzentrationsabhängig reduziert wurde, während andere Detergenzien wie Tween-20 und CHAPS die Aktivität nicht beeinflussten. [125] Triton X-100 scheint folglich den Assay in bestimmten Fällen und in einer bis jetzt ungeklärten Art und Weise zu stören. Padmanabhan *et al.* stellten bei Aktivitätsmessungen mit der West-Nil-Virus-Protease fest, dass Triton X-100, Tween-20 und NP40 im untersuchten Fall für die Unterscheidung zwischen unspezifischen und

kompetitiven Inhibitoren nicht geeignet sind. Empfohlen wird in dieser Publikation die Verwendung von CHAPS. Beobachtet wurde, dass die Inhibition eines gut untersuchten, selektiven Inhibitors in Anwesenheit von Triton X-100 ($M = 624,82 \text{ g/mol}$) signifikant reduziert wurde. [126] In einem Experiment wurde die Tritonkonzentration im Bereich von 0,0001 % - 0,01 % (entspricht 0,00016 % - 0,016 mmol pro 100 g Puffer) variiert und die entsprechenden Inhibitionswerte in Prozent von zwei Verbindungen bestimmt und untereinander verglichen. In **Abbildung 40** sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe dargestellt.

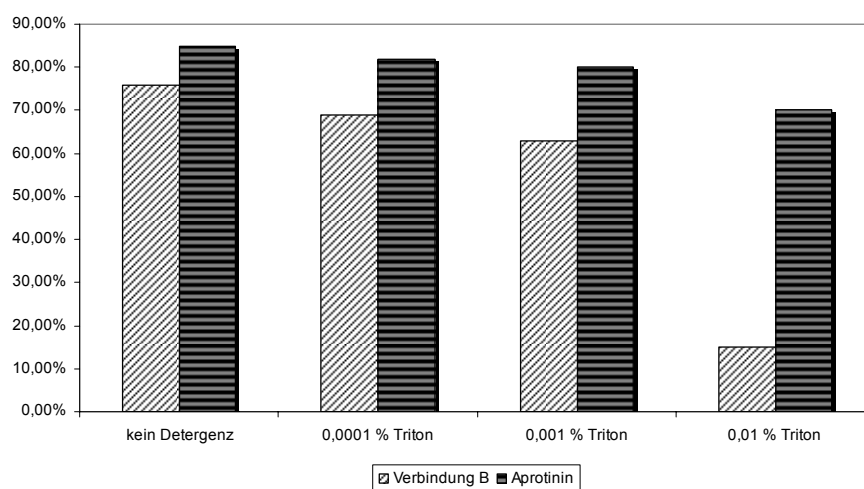


Abbildung 40: Effekt von Triton X-100 auf die Inhibition der West-Nil-Virus-Protease durch die Verbindung B (keine Struktur des Moleküls bekannt) und Aprotinin. Der Assay wurde in An- und Abwesenheit von Triton X-100 (Gew.-%) und bei $2 \mu\text{M}$ Aprotinin (dunkle, quer gestreifte Säulen) und bei $20 \mu\text{M}$ der Verbindung B (helle, schräg gestreifte Säulen) durchgeführt. Aufgetragen ist die Inhibition in % unter den jeweiligen Bedingungen. [126]

In Abhängigkeit von der Tritonkonzentration verschlechtern sich die Affinitätswerte der Verbindung B von 75 % auf 15 % deutlich. Je höher die Konzentration von Triton X-100 ist, desto größer ist die Abnahme der Inhibition. Im beschriebenen Fall ist bei einer Tritonkonzentration von 0,01 %, was der halben Mizellenbildungskonzentration (CMC) entspricht, die Inhibition von Verbindung B um 80 % vermindert. Überraschenderweise wird die Hemmung von Aprotinin kaum durch die Tritonkonzentration beeinflusst. Bei der Verwendung des Detergenz CHAPS ($M = 614,88 \text{ g/mol}$) konnte dieses Phänomen für beide Substanzen nicht beobachtet werden, und über den getesteten Konzentrationsbereich von 0,001 % - 0,1 % (entspricht 0,0016 mmol - 0,16 mmol pro 100 g Puffer) blieb der Inhibitionswert konstant. [126]

In Anlehnung an diese Beobachtungen und um festzustellen, ob im Fall der HIV-Protease zusammen mit AB111 und eventuell auch mit dem Hydroxylamin **30b** ein ähnlicher Effekt auftritt, wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt. Zuerst wurde AB111 bei verschiedenen Tritonkonzentrationen im Assay vermessen und die jeweilige Hemmwirkung bei 1 μM Inhibitorkonzentration bestimmt. Analog dazu wurden Werte mit BSA als Detergenz und ohne Detergenz gemessen. In **Abbildung 41** sind die Ergebnisse dieses Experiments graphisch dargestellt.

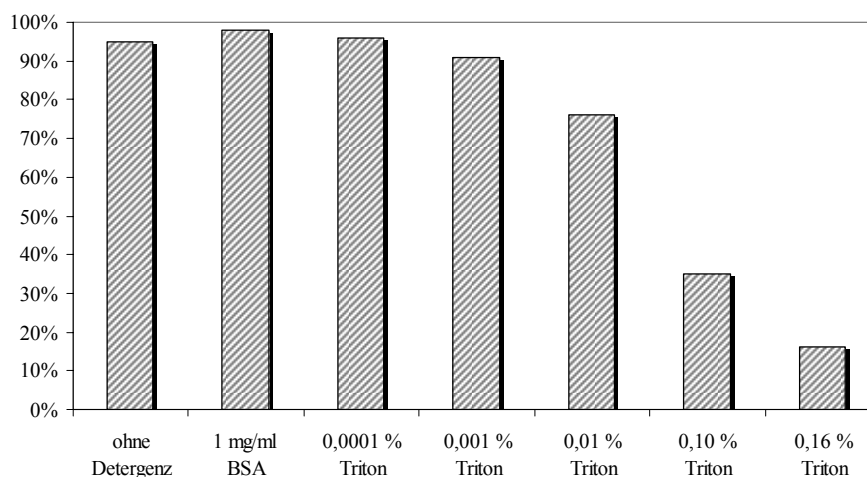


Abbildung 41: Effekt von Triton X-100 auf die Inhibition von AB111 gegen HIV-Protease. Dargestellt ist die Inhibition in % von AB111 bei 1 μM in Anwesenheit unterschiedlicher Detergenzien und variierenden Triton-Konzentrationen (in Gew.-%).

Es wird sofort deutlich, dass die Inhibition mit steigenden Triton-Konzentrationen signifikant abnimmt. Bei 0,1 % Triton X-100 ist der Affinitätswert bis zu 60 % reduziert und bei 0,16 % sogar bis zu 80 %. Eine leichte Abweichung von rund 20 % ist selbst bei einer Konzentration von 0,01 % Triton X-100 festzustellen. Unterhalb dieser Marke ist jedoch innerhalb der Fehlergenauigkeit des Assays kein Unterschied zur BSA-Methode oder zur Messung ohne Detergenz mehr erkennbar. Analog hierzu wurde das Experiment mit dem Detergenz CHAPS durchgeführt, dessen Ergebnisse in **Abbildung 42** dargestellt sind. In diesem Fall scheint das Detergenz keinen negativen Effekt auf das Assay-Ergebnis auszuüben. Bei allen getesteten Tensidkonzentrationen konnte das Ergebnis der BSA-Messung reproduziert werden.

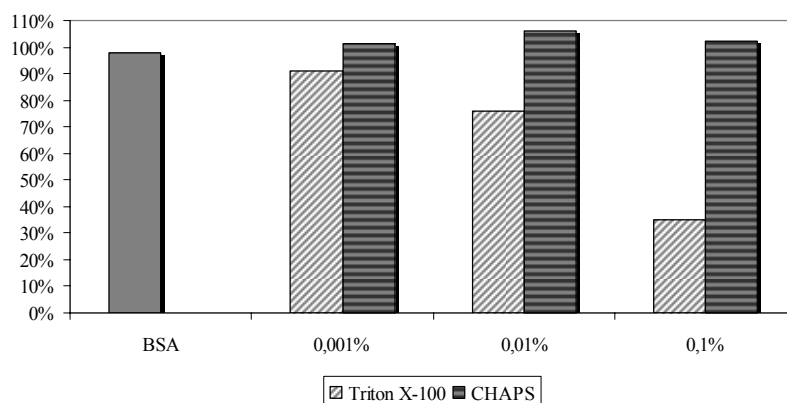


Abbildung 42: Effekt des Detergenzes CHAPS auf die Inhibition der HIV-Protease durch AB111 im Vergleich zu Triton X-100. Dargestellt ist die Inhibition in % von AB111 bei 1 μ M in Anwesenheit variierender CHAPS- und Triton-Konzentrationen im Vergleich (Gew.-%).

Generell sollte die maximale Detergenzkonzentration im Assay die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) des jeweiligen Detergenz nicht überschreiten. Oberhalb dieser Konzentration kann schlagartig eine Selbstaggregation der Tensidmoleküle zu Mizellen einsetzen. Dabei befinden sich die hydrophoben Molekülteile im Inneren des Aggregats, während die hydrophilen Reste die Mizellenoberfläche bilden. Dieses Verhalten kann den Ablauf des Enzym-Assays beeinflussen und zu verfälschten Ergebnissen führen. [126] In **Tabelle 6** sind die CMCs herkömmlicher Detergenzien und die daraus resultierenden Maximalkonzentrationen im Assay dargestellt. Für Triton ergibt sich mit einer CMC von 0,5 mM eine maximale Konzentration von 0,03 % für den Enzym-Assay. Die von Shoichet *et al.* empfohlene und anfänglich gewählte Konzentration von 0,1 % Triton X-100 liegt damit oberhalb der CMC. [123]

Detergenz	CMC	Maximal- konzentration im Assay
CHAPS	8 mM	0,49%
Triton X-100	0.5 mM	0,03%
Brij-35	0.09 mM	0,01%
Tween20	59 μ M	0,01%

Tabelle 6: Herkömmliche Detergenzien mit den kritischen Mizellbildungskonzentrationen (CMC) und die daraus resultierenden Maximalkonzentrationen im Assay.

Die beiden höchsten mit AB111 getesteten Triton-Konzentrationen liegen mit 0,16 % und 0,1 % über der CMC von Triton X-100, weshalb hier die Abweichung zum Teil durch den Effekt der Selbstaggregation des Tensids erklärbar sein könnte. Die Konzentration von 0,01 % Triton X-100 liegt allerdings unterhalb der CMC und sollte deshalb keinen Effekt auf die Affinitätsbestimmung haben. Die vorliegenden Experimente in dieser Arbeit bestätigen grundsätzlich die Ergebnisse von Padmanabhan *et al.* auch im HIV-Protease-Assay, wenn auch die Auswirkungen auf AB111 bei 0,01 % nicht so deutlich beobachtet wurden wie im Fall von Verbindung B. Dieses Phänomen ist offensichtlich sehr stark von den Eigenschaften der untersuchten Verbindung abhängig. Einige Moleküle zeigen mehr, andere weniger starke Triton-Abhängigkeit. Ein Zusammenhang zwischen der Struktur oder den molekularen Eigenschaften und der Triton-Abhängigkeit konnte anhand dieser Experimente nicht abgeleitet werden. Es ist aber denkbar, dass gewisse Strukturmerkmale in einer Verbindung für den beobachteten Effekt verantwortlich gemacht werden können. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse wurde die erste Charge des Hydroxylamins **30b**, das zuerst als ein unspezifischer Binder definiert worden war, noch einmal genauer untersucht. Es wurde bei unterschiedlichen CHAPS-Konzentrationen (0,01 % - 0,5 %) sowie bei niedrigeren Tritonkonzentrationen (0,001 % - 0,1 %) im HIV-Protease-Assay getestet. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in Form der IC₅₀-Werte für **30b** in **Tabelle 7** dargestellt.

Detergenz	Konzentration	IC ₅₀ [μM]
BSA	1 mg/ml	k.I.
TritonX-100	0,1 %	k.I.
	0,01 %	k.I.
	0,001 %	12
	0,0003 %	16
Tween20	0,0003 %	16
CHAPS	0,5 %	7
	0,1 %	1
	0,01 %	3
ohne Detergenz		2

Tabelle 7: Detergenzien und Konzentrationen die im Enzym-Assay mit dem Hydroxylamin **30b** (Charge 1) getestet wurden, sowie die dazugehörigen IC₅₀-Werte.

Das Hydroxylamin zeigt bei allen CHAPS-Konzentrationen einen ähnlichen IC_{50} -Wert zwischen $1\ \mu M$ und $7\ \mu M$. Damit liegen diese in der gleichen Größenordnung wie das Ergebnis der Messung ohne Detergenz, das mit $2\ \mu M$ bestimmt werden konnte. Auch die niedrigen Konzentrationen der Detergenzien Triton X-100 und Tween20 zeigen jetzt Affinitätswerte von 12 bzw. $16\ \mu M$.

Dieses Ergebnis unterstützt die These von Padmanabhan *et al.* und Chung *et al.*, dass Detergenzien konzentrationsabhängig einen negativen Einfluss auf das Assay-System nehmen können. [125, 126] Offensichtlich besitzt Triton X-100 auch im Fall des Hydroxylamins neben den tensidischen Eigenschaften die Eigenart, das Assay System auf eine bis jetzt unbekannte Art und Weise zu stören. Es scheint unwahrscheinlich, dass die Reduktion der Inhibition in Gegenwart von Triton X-100 ausschließlich auf die Auflösung von Aggregaten und damit die Verhinderung einer unspezifischen Inhibition zurück zu führen ist. Die Versuche mit anderen Detergenzien bestätigen diese Vermutung, da diese ebenfalls in der Lage sind, eine Aggregatbildung zu unterbinden und trotzdem eine Inhibition durch das Hydroxylamin beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Detergenzien dazu benutzt werden können, unspezifische von klassischen Inhibitoren zu unterscheiden. Allerdings muss das ausgewählte Detergenz in einer angemessenen Konzentration eingesetzt werden, ohne den Ablauf des Assays zu beeinträchtigen. Bevor also eine Verbindung als unspezifischer Binder identifiziert und von weiteren Arbeiten ausgeschlossen wird, sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um dieses erste Ergebnis zu bestätigen oder zu korrigieren. Eine Abnahme der Affinität, die durch den Zusatz eines Detergenz hervorgerufen wurde, kann auch durch andere, bis jetzt ungeklärte Effekte hervorgerufen werden. Die Auswahl und Verwendung von Detergenzien sowie die Auswertung der Assay-Ergebnisse sollten daher mit besonderer Achtsamkeit durchgeführt werden. Als Konsequenz dieser Resultate wurden im HIV-Protease-Assay alle Hydroxylamine mit einer Tritonkonzentration von 0,001 % getestet. Zusätzliche CHAPS-Kontrollen sollten dafür sorgen, dass fehlerhafte Messungen sowie andere Probleme im Assay erkannt werden können und darauf gegebenenfalls durch zusätzliche Untersuchungen reagiert werden kann. Alle anderen Verbindungen dieser Arbeit wurden im Assay mit BSA als Detergenz gemessen. Um eine mögliche BSA-Proteinbindung zu identifizieren wurden auch hier gleichzeitig CHAPS-Kontrollen durchgeführt.

2.5.2 Polymorphismus und dessen Auswirkungen

Schon im vorangegangenen Abschnitt wurde das Hydroxylamin **30b** und dessen Eigenschaften im Assay eingehend untersucht. Zu Beginn dieser Arbeit wurde dieses Hydroxylamin **30b** in einer ersten Charge dargestellt. Drei Jahre später wurde die gleiche Verbindung **30b** erneut synthetisiert (2. Charge) und eine Aktivitätsmessung gegen die HIV-Protease durchgeführt.

Überraschenderweise konnte mit der zweiten Charge der Assay mit einer BSA-Konzentration von 1 mg/ml durchgeführt und ein K_i -Wert von 4 μ M bestimmt werden. Damit stimmt der gefundene K_i -Wert zwar mit dem der ersten Charge überein, allerdings zeigte dieses in Anwesenheit von BSA im damaligen Assay überhaupt keine Aktivität gegenüber der HIV-Protease. Wie kann also ein solch unterschiedliches Verhalten ein und derselben Verbindung erklärt werden?

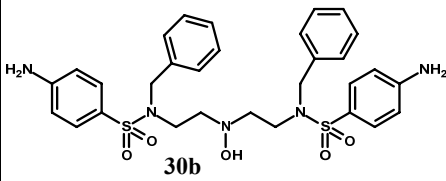
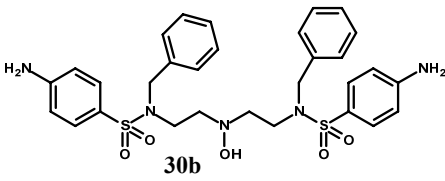
Bezeichnung	1. Charge	2. Charge
chemische Struktur		
Herstellungsjahr	2008	2011
Fließmittel MPLC	DCM:MeOH 9:1	DCM:EtOAc bis 1:1
ESI $[M+H]^+$	610 g/mol	610 g/mol
NMR-Analytik	stimmt mit Verbindung 30b überein	stimmt mit Verbindung 30b überein
Smp.	95 °C	70 °C
Löslichkeit in $CHCl_3$	nein	ja

Tabelle 8: Vergleich der beiden Chargen der Substanz **30b**, deren chemische Strukturen identisch sind, die aber von einander abweichende physikalische Eigenschaften aufweisen.

Dass es sich bei der ersten und zweiten Charge tatsächlich um identische Verbindungen handelt, konnte letztlich über 1H -NMR, ^{13}C -NMR und Massenspektrometrie eindeutig belegt werden. Beide Verbindungen zeigten zunächst eine Masse von

$[M+H]^+ = 610$ g/mol. In **Tabelle 8** sind die beiden Chargen des Hydroxylamins **30b** einander gegenübergestellt. Die NMR-Spektren der ersten Charge mussten aufgrund von Löslichkeitsproblemen in DMSO (d_6 -DMSO) aufgenommen werden, während für die zweite Charge Chloroform als Lösungsmittel möglich war. Die Auswertung der Spektren offenbarte dann, dass es sich bei den beiden Chargen tatsächlich um ein und dasselbe Hydroxylamin **30b** handeln musste. Im Anschluss an diesen Vergleich wurde der Schmelzpunkt von Substanzproben aus den beiden Herstellungen untersucht. Für die zweite Charge wurde ein Wert von 70 °C gefunden, während für die erste Charge ein Schmelzpunkt von 95 °C bestimmt werden konnte. Dieser erstaunlich große Unterschied im Schmelzpunkt von 25 °C ließ vermuten, dass die beiden Chargen offensichtlich in unterschiedlichen Kristallformen vorliegen, wobei die erste möglicherweise die thermodynamisch stabilere Form einnimmt. Die Fähigkeit einer kristallinen Substanz, in mehr als einer Kristallform mit unterschiedlichen Elementarzellen vorzukommen, wird als Polymorphie (*poly* (gr.) = viele, *morphe* (gr.) = Form, Gestalt) bezeichnet. Diese individuellen Kristallformen können große Unterschiede in physikalischen Eigenschaften, wie beispielsweise der Löslichkeit, hervorrufen. Treten diese Veränderungen z. B. in Arzneimitteln auf, kann dies einen negativen Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit haben. Ein prominentes Beispiel, in dem das Auftreten einer zweiten Kristallform dramatische Auswirkungen hatte, ist der HIV-Protease-Inhibitor Ritonavir. Ritonavir wurde 1996 von *Abbott* unter dem Handelsnamen Norvir als hochwirksames Medikament gegen HIV eingesetzt. Da der Inhibitor in fester Form keine Bioverfügbarkeit aufweist, wurde er in einer Lösung, basierend auf einem Ethanol/Wassergemisch, verabreicht. Ein Auszug aus den Richtlinien der ICH (International Committee on Harmonization) besagt: „*For a drug product that is a solution, there is little scientific rationale for polymorph control*“. [127] Doch zwei Jahre später (1998), in der 241. Charge von Ritonavir, fiel der Wirkstoff in einer bis dahin unbekannten, orthorhombischen Kristallform an, die sich in Ethanol/Wasser (75:25) nur noch mit 30 mg/ml löste, während die ursprünglich monokline Kristallform mit 170 mg/ml eine wesentlich bessere Löslichkeit aufwies. Die therapeutisch erforderliche Dosis des Medikaments konnte mit der neuen Kristallform also nicht mehr erreicht werden. Ab diesem Zeitpunkt war es den Chemikern bei *Abbott* allerdings auch nicht mehr möglich, die ursprüngliche Kristallform des Ritonavirs herzustellen, so dass Ritonavir folglich vom Markt genommen werden musste. Nach einem Jahr Abstinenz wurde es in der orthorhombischen Kristallform in einer neuen Darreichungsform, als Gel, wieder zugelassen. [127, 128]

Um festzustellen, ob die beiden anhand des unterschiedlichen Aufreinigungsschrittes erhaltenen Chargen der Verbindung **30b** ebenfalls stark abweichende Eigenschaften aufweisen, wurden die nachfolgend beschriebenen Experimente durchgeführt. Die DMSO-Lösungen der beiden Substanzen, die für die Aktivitätsbestimmungen verwendet worden waren, wurden hierfür unter dem Mikroskop betrachtet, um eventuell einen Hinweis auf das unterschiedliche Verhalten im Assay zu erhalten. Dazu wurden die Lösungen zunächst zentrifugiert; anschließend wurde zeitgleich jeweils 1 µl auf einen Objektträger pipettiert. Die beiden Tropfen wurden unter dem Mikroskop beobachtet. Zum Zeitpunkt Null waren beide Tropfen völlig klar und es war kein Unterschied erkennbar. Nach ca. eineinhalb Minuten war allerdings beim Tropfen der ersten Charge schon eine leichte Ausflockung sichtbar, während der Tropfen der zweiten Charge noch unverändert klar blieb. Nach weiteren fünf Minuten war das Präzipitat im Tropfen der ersten Charge extrem verdichtet, während im Tropfen der zweiten Charge auch weiterhin keine Ausflockung beobachtet werden konnte. Beide Tropfen wurden vor und nach dem Experiment gewogen, um eventuelle Unterschiede in der Verdunstungsgeschwindigkeit der beiden Tropfen zu erkennen. Allerdings ergab diese Bestimmung keine Abweichung. Dieses Experiment verdeutlichte das Vorhandensein unterschiedlicher Lösungseigenschaften und die erhöhte Neigung der ersten Charge, auszufallen. Würde folglich die Verbindung der ersten Charge während der Aktivitätsbestimmungen aus der Messlösung ausfallen, stünde der Inhibitor praktisch nicht mehr zur Verfügung, um die HIV-Protease zu hemmen und den Abbau des Substrates zu stoppen. Damit würde die Messung das Ergebnis „nicht aktiv“ liefern. Im Gegensatz dazu bliebe die Verbindung der zweiten Charge wegen ihrer besseren Lösungseigenschaften gelöst und kann die HIV-Protease inhibieren. Um die Auswirkungen der Lösungsunterschiede auch unter realen Assaybedingungen zu untersuchen, wurden sowohl für die erste Charge als auch für die zweite Charge fünf Verdünnungen im Assaypuffer ohne Detergenz und in Anwesenheit der Detergenzien BSA (1 mg/ml) und Triton X-100 (0,001 %) hergestellt. Die Verdünnungen, die ohne Detergenz und mit Triton-X-100 als Detergenz hergestellt wurden, waren für beide Verbindungen identisch. Bei Betrachtung unter dem Mikroskop konnte kein Unterschied zwischen diesen Lösungen erkannt werden. Hingegen zeigte sich, dass die BSA-Verdünnungen der Substanz der ersten Charge augenscheinlich trüb waren, während für die BSA-Verdünnungen der zweiten Charge dies nicht beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse können das unterschiedliche Verhalten der ersten und zweiten Charge in der Assaymessung erklären. Der K_i -Wert der zweiten Charge ließ sich mit BSA als Detergenz in einer Konzentration von 1 mg/ml bestimmen, während dies für

die erste Charge nicht möglich war, weil der Inhibitor unter diesen Bedingungen aus der Assaylösung ausfiel. Die Messung mit Triton X-100 (0,001 %) ergab sowohl für die erste als auch für die zweite Charge ein vergleichbares Ergebnis. Unter diesen Bedingungen waren beide Varianten gelöst und die Ausfällung der Substanz konnte verhindert werden. Auch die Messung ohne Detergenz der ersten Charge ergab einen mit den anderen Messungen vergleichbaren Wert. Damit konnte unzweideutig gezeigt werden, dass unterschiedliche Chargen einer identischen Verbindung sehr unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen können, die auch die Assaydurchführung signifikant beeinflussen. Als eine Erklärung für das beschriebene Verhalten kann die Existenz der Verbindung in unterschiedlichen Kristallformen angeführt werden. Um diese Vermutung abzusichern, können Pulverdiffraktometrie-Spektren aufgenommen oder Röntgenkristallographien von Einkristallen beider Chargen durchgeführt werden. Bis zum Einreichen dieser Arbeit konnten die Ergebnisse dieser Experimente leider noch nicht erhalten werden.

2.5.3 Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen und Diskussion

2.5.3.1 Offenkettige, primäre Amine

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Affinitätsbestimmungen der synthetisierten Verbindungen vorgestellt und die resultierenden Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) diskutiert. In **Tabelle 9** sind die K_i -Werte der primären Amin-Derivate sowohl gegen die HIV-Protease als auch gegen Endothiapepsin dargestellt. Basierend auf dem modellierten Bindungsmodus für diese Inhibitor-Klasse könnte die Taschenbesetzung wie folgt angenommen werden: der Sulfonamid-Rest ragt in die S2- bzw. S2'-Tasche, während der Substituent R in der S1- bzw. S1'-Tasche hydrophobe Wechselwirkungen aufbauen kann. Anhand der Ergebnisse für die Verbindungen mit der Linkerlänge von 1/1 kann für den Substituenten R, der die S1-Tasche adressieren soll, eine SAR aufgestellt werden. Die Affinität zum Enzym nimmt in der Reihenfolge Benzyl < 4-CF₃-Benzyl zu. In der Serie der Amin-Derivate **47a-b** ist dieser Trend für beide Enzyme sichtbar. Bei der HIV-Protease steigt die Affinität von 53 μ M auf 23 μ M um den Faktor 2 an, während bei Endothiapepsin eine Verbesserung von 12,2 μ M auf 2,9 μ M (Faktor 4) erreicht werden kann. Damit ergibt sich eine nachvollziehbare Korrelation für die S1-Taschenbesetzung. Die schwächste Interaktion in der S1-Tasche wird demnach vom kleinsten Substituenten, der die geringsten hydrophoben Kontakte in der S1-Tasche aufbauen kann, hervorgerufen. Im weiteren Verlauf können die hydrophoben Wechselwirkungen durch größere und aromatische Reste deutlich erhöht werden. Das 2-Naphthyl-Derivat **47d** zeigt gegen Endothiapepsin noch eine weitere Affinitätssteigerung auf insgesamt moderate 1,3 μ M. Ein Affinitätswert gegen die HIV-Protease konnte für diese Verbindung leider aufgrund der zu hohen Eigenfluoreszenz und zu schwacher Aktivität nicht bestimmt werden. Eine Aussage über eine mögliche Verbesserung für den Naphthyl-Rest ist demnach nicht abgesichert. Für das 4-Brombenzyl-Derivat **47c** konnte gegen Endothiapepsin erstaunlicherweise keine Inhibition festgestellt werden, während gegen die HIV-Protease ein zum Benzyl-Derivat **47a** vergleichbarer Wert bestimmbar war. Es lässt sich vermuten, dass dieser Rest nicht mehr optimal in die Tasche passt und gegebenenfalls partiell mit der Oberfläche des Enzyms zusammenstößt. Betrachtet man allerdings dazu im Vergleich die entsprechenden Carboxamid-Derivate **49a-c**, so stellt man hier nun wieder eine Verbesserung der Affinität des 4-Brom-Derivats **49b** gegenüber dem Benzyl- **49a** und dem *iso*-Butyl-Derivat **49c** fest. Dieser Unterschied könnte z. B. auf

unterschiedliche Bindungsmodi der Amin- **47** und Carboxamid-Derivate **49** zurück geführt werden.

	R	X	n	HIV-Protease K_i /[μ M]	Endothiapepsin K_i /[μ M]
48d			1	214	21,1
49a			1	250	13,7
49b			1	37,7	7,0
49c			1	>280	86,8
47a			1	53,2	12,2
47b			1	23,0	2,9
47c			1	44,0	k. I.
47d			1	k. I.	1,3
43a			2	23,4	2,8
43b			2	22,1	0,55

Tabelle 9: Affinitätswerte der synthetisierten Verbindungen der Serinol-Abkömmlinge gegenüber der HIV-Protease und Endothiapepsin. „k. I.“ steht für keine Inhibition. Für Verbindung **47d** konnte aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz kein K_i -Wert gegen die HIV-Protease bestimmt werden; gegen Endothiapepsin war die Eigenfluoreszenz ebenfalls zugegen, aber dank der wesentlich besseren Affinität konnte hier dennoch ein K_i -Wert bestimmt werden.

Die Analyse der Daten für die HIV-Protease führt zu weiteren Erkenntnissen. Die Aminogruppe in *p*-Position des Benzol-Sulfonamids ist gegenüber der Carboxamidfunktionalität in der S2-Tasche bevorzugt. Der Austausch der Amid-Funktion in **49a** gegen eine Aminogruppe (**47a**) in *p*-Position resultiert in einer Verbesserung des K_i -Werts um den Faktor 4. Darüber hinaus ist bei der HIV-Protease eine deutliche Präferenz für den Ethylenlinker erkennbar. Der Inhibitor mit der kürzeren

Linkerlänge **49a** ist im Vergleich zu Verbindung **43a** weniger affin, was sich in einer Reduktion des K_i -Werts um den Faktor 10 bemerkbar macht.

Endothiapepsin scheint die Variation der Linkerlänge besser zu tolerieren als die HIV-Protease. Dennoch ist die Tendenz hin zum Ethylenlinker ebenfalls erkennbar. Verbindung **49a** besitzt gegenüber Endothiapepsin einen K_i -Wert von 13,7 μM , während für das entsprechende langkettige Derivat **43a** ein Wert von 2,8 μM bestimmt werden konnte. Daraus ergibt sich durch die Linkerverlängerung eine fünffache Verbesserung der Affinität zum Enzym. Der Vergleich der X-Gruppe in *p*-Position vom Amin zum Amid ergibt im Gegensatz zur HIV-Protease bei Endothiapepsin keine eindeutige Bevorzugung einer der beiden Gruppen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den Serinol-Abkömmlingen für die Interaktion mit der HIV-Protease keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden konnten. Die Verbindungen **43a-b** und **47b** stellen mit ca. 20 μM die affinsten Inhibitoren dieser Serie dar. Gegen Endothiapepsin ergaben sich für alle dargestellten Verbindungen deutlich bessere Affinitätswerte. Die relativen Tendenzen innerhalb der Serie sind mit wenigen Ausnahmen in beiden Testsystemen identisch, jedoch sind die absoluten Affinitätswerte im Fall des Endothiapepsins wesentlich besser. Der potenteste Inhibitor dieser Serie gegen Endothiapepsin ist Verbindung **43b**, allerdings konnte mit 550 nM ein erheblich überzeugenderer K_i -Wert erreicht werden als gegen die HIV-Protease. Bevor diese Verbindungsklasse weiter optimiert werden kann, sollte zunächst der Bindungsmodus mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden, um aus diesem Hinweise auf vielversprechende Substitutionsmuster abzuleiten.

2.5.3.2 Zyklische Harnstoffe

Die K_i -Werte der aus den kurz-kettigen primären Aminen hervorgegangenen zyklischen Harnstoffe sind in **Tabelle 10** dargestellt. Alle synthetisierten Verbindungen hemmen die HIV-Protease nur schwach, obwohl die generierten Dockinglösungen auf dieses Enzym besonders gut bewertet wurden. Wie auch bei den primären Aminen festgestellt werden konnte, weist dieses Grundgerüst ebenfalls höhere Affinitäten gegenüber Endothiapepsin auf. Für Endothiapepsin konnte der K_i -Wert von keinerlei Inhibition für die Verbindung **61c** mit dem 2-Naphthyl Derivat **61d** bis in den einstellig mikromolaren Bereich verbessert werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die zyklischen Harnstoffe relativ kleine Verbindungen mit nur zwei Substituenten sind, die die Spezifitätstaschen adressieren können, ist dies insgesamt als vielversprechendes

Ergebnis zu werten. Um diese Aussage mit Daten zu untermauern, wurden die Liganden-Effizienzen sowie die sogenannte „*fit quality*“, deren Funktion im Folgenden erläutert wird, für die Verbindungen dieser Serie bestimmt und in **Tabelle 11** zusammengetragen.

	R	HIV-Protease K _i [μM]	EP K _i [μM]
61a		k. I.	> 300
61b		k. I.	15,4
61c		k. I.	k. I.
61d		100,0	2,0
63a		k. I.	8,1
63b		49,4	16,2

Tabelle 10: Affinitätswerte der synthetisierten Verbindungen der zyklischen Harnstoff-Derivate gegenüber der HIV-Protease und Endothiaepsin (EP); k. I. steht für keine Inhibition.

Die Liganden-Effizienz (LE) beschreibt die freie Bindungsenergie für einen Liganden geteilt durch die Anzahl der „heavy atoms“ (HA oder auch oft als „non-hydrogen atoms“ bezeichnet). Damit ist die LE ein gebräuchlicher Parameter, um die Affinitäten unterschiedlicher Liganden besser miteinander vergleichen zu können. [129] Zur Bestimmung der Liganden-Effizienz muss die Bindungskonstante K_i zunächst in die freie Bindungsenergie ΔG umgerechnet werden. Dies kann mit Hilfe der folgenden Gleichung erfolgen [130]:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_i \quad \text{Formel 2}$$

$$\text{mit } R = 1,98 \cdot 10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1} \text{ und } T = 300 \text{ K}$$

Die Liganden-Effizienz pro HA ergibt sich aus

$$LE = \frac{\Delta G}{HA}$$

Formel 3

Daraus folgt, dass Liganden effizienter sind, wenn sie im Vergleich zueinander die gleiche Affinität mit weniger „heavy atoms“ erreichen. [131]

Beispielsweise ergibt sich für einen Kandidaten in der Wirkstoffentwicklung mit einem Molekulargewicht unter $500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (durchschnittlich 38 „heavy atoms“) und einer Aktivität im hoch affinen Bereich (10 nM) eine Liganden-Effizienz von $0,29 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Für Saquinavir ergibt sich als hoch potenter Inhibitor der HIV-Protease und zugelassenem Wirkstoff zur Behandlung von AIDS eine LE von $0,27 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Aus empirischen Daten geht hervor, dass Liganden-Effizienzen mit Vergrößerung des Molekulargewichts rapide abfallen, bis sie bei sehr großen Verbindungen (> 45 „heavy atoms“) ein Plateau erreichen. Liganden-Effizienzen sind damit abhängig vom Molekulargewicht der Liganden. Dieser Effekt kann auf zwei physikalische Phänomene zurückgeführt werden [132]: die zugängliche Oberfläche pro Atom, die dem Liganden zur Verfügung steht, um Interaktionen in der Bindetasche des Enzyms aufzubauen, verringert sich mit zunehmender Größe. Hervorgerufen wird dieses Phänomen durch die immer größer werdende „vergrabene“ Oberfläche bei stark verzweigten Verbindungen. Zweitens muss ein größerer Ligand während der Bindung an das Zielenzym zwangsläufig größere Konformationsänderungen in Kauf nehmen. Beide Faktoren reduzieren die Liganden-Effizienz größerer Liganden. Die Tatsache, dass die LE von dem Molekulargewicht des Liganden abhängig ist, macht einen direkten Vergleich über einen weiten Molekulargewichtsbereich schwierig. Aus diesem Grund wurde die „fit quality“ (FQ), die eine bessere Vergleichbarkeit gestattet, als weiterer Parameter eingeführt. [131] Die „fit quality“, die empirisch aus einem Datensatz aktiver Liganden abgeleitet wurde, berechnet sich wie folgt:

$$LE_Scale = 0,0715 + \frac{7,5328}{HA} + \frac{25,7079}{HA^2} - \frac{361,4722}{HA^3}$$

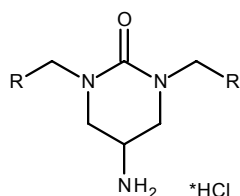
Formel 4

$$FQ = \frac{LE}{LE_Scale}$$

Formel 5

mit HA: Anzahl der „heavy atoms“; FQ: „fit quality“ und LE: Liganden-Effizienz

In diesem Parameter wird das Molekulargewicht stärker berücksichtigt und die Verbindungen des Datensatzes, die die höchste Effizienz zeigten, werden über einen größeren Molekulargewichtsbereich auf 1,0 normalisiert. Für weniger affine Liganden mit schlechteren LEs ergeben sich niedrigere Werte (z. B. FQ = 0,4).



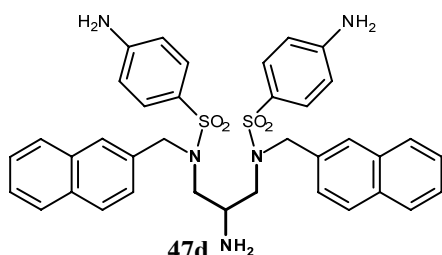
	R	EP K _i [μM]	LE [kcal·mol ⁻¹]	FQ
61a		> 300	< 0,22	< 0,51
61b		15,4	0,24	0,66
61d		2,0	0,26	0,77
63a		8,1	0,29	0,72
63b		16,2	0,27	0,68

Tabelle 11: Dargestellt sind die Liganden-Effizienzen (LE) und die „fit quality“ (FQ) der zyklischen Harnstoffe gemessen gegen Endothiapepsin.

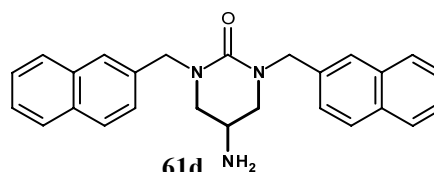
Startpunkt dieser Serie war das Benzyl-Derivat **61a**, das mit einem Molekulargewicht von 295 g·mol⁻¹ Fragmentcharakter besitzt. Die resultierende Liganden-Effizienz (LE) für das Fragment mit < 0,22 kcal·mol⁻¹ und eine FQ von < 0,51 scheint ein lohnender Ausgangspunkt zu sein, um diese Substanzklasse durch Optimierung der Substituenten zu verbessern. Die Liganden-Effizienz konnte durch Variation der Substituenten von 0,22 kcal·mol⁻¹ bis auf 0,29 kcal·mol⁻¹ verbessert werden und auch die FQs verdeutlichen, dass die Ligandenbindungsaffinität deutlich gesteigert werden konnte. Das 2-Naphthylderivat **61d** erreicht mit einer FQ von 0,77 einen sehr guten Wert und stellt damit den besten Liganden dieser initialen Serie dar.

Vergleicht man strukturell den zyklischen Harnstoff **61d** mit dem entsprechenden offenkettigen Aminderivat **47d**, so ergibt sich für beide Verbindungen eine Linkerlänge von eins (**Abbildung 43**). Für beide Inhibitoren wurde gegenüber Endothiapepsin ein Affinitätswert im selben Größenordnungsbereich von 1,3 und 2 μM gefunden. Obwohl das offenkettige Derivat vier statt nur zwei Spezifitätstaschen besetzen kann und somit

die hydrophoben Wechselwirkungen verbessert werden, wird also dennoch kein Affinitätsgewinn erreicht. Wahrscheinlich wird dieser Energiegewinn aufgrund der vielen frei drehbaren Bindungen, die die sehr flexible Struktur **47d** aufweist, wieder durch einen erheblichen Entropieverlust eingebüßt.



K_i (EP) = 1,3 μ M \rightarrow LE = 0,17 \rightarrow FQ = 0,71
 K_i (HIV-PR) = k.I.



K_i (EP) = 2,0 μ M \rightarrow LE = 0,26 \rightarrow FQ = 0,77
 K_i (HIV-PR) = 100 μ M

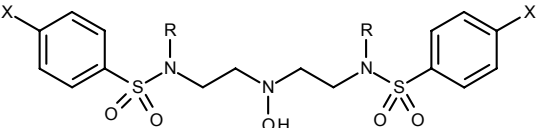
Abbildung 43: Vergleich der beiden Grundgerüste gegenüber Endothiapepsin und HIV-Protease; dargestellt sind die 2-Naphthyl-derivate des offenkettigen primären Amins sowie des zyklischen Harnstoffs inklusive der Affinitätswerte.

Grundsätzlich wird ein Inhibitor durch die Bindung an ein Enzym in einer Konformation mehr oder minder fixiert. Ein sehr flexibles Molekül verliert durch die Bindung seine Rotationsfreiheitsgrade, was sich in einem Verlust an Entropie widerspiegelt. Im Vergleich dazu verliert ein von vornherein rigider Inhibitor wie der zyklische Harnstoff durch die Bindung an ein Enzym kaum Rotationsfreiheitsgrade. Dadurch ergibt sich für einen rigiden Inhibitor ein geringerer Entropieverlust als für einen flexiblen. Der zyklische Harnstoff kann folglich die fehlenden hydrophoben Interaktionen in den Spezifitätstaschen durch die Rigidität des Grundgerüsts ausgleichen. In der Einführung von zwei weiteren Substituenten am Ring des zyklischen Harnstoffs bestünde eventuell eine Möglichkeit, die Affinität dieser Inhibitorklasse weiter zu erhöhen.

2.5.3.3 Hydroxylamine

In **Tabelle 12** sind die Affinitätswerte der Hydroxylamin-Derivate dargestellt. In Anlehnung an die offenkettigen primären Amine wurde dieses Grundgerüst an den gekennzeichneten Positionen variiert. Zur Ausleuchtung der S1-Tasche wurden die Substituenten R von *iso*-Butyl über Benzyl, 2-Naphthyl bis hin zum 4-CF₃-Benzyl modifiziert. Für die Adressierung der S2-Tasche wurde sowohl der 4-Aminophenylsubstituent als auch der 4-Carboxamidrest getestet. Die Ergebnisse

erlauben die Schlussfolgerung, dass das Hydroxylamin-Motiv im Vergleich zum primären Amin das besser geeignete Strukturelement zur Adressierung des katalytischen Zentrums der HIV-Protease ist. Dies wird besonders deutlich beim Vergleich von **43b** und **28c**, die dasselbe Substitutionsmuster besitzen. Das analoge Hydroxylamin **28c** ist um den Faktor 6 affiner. Im Fall von **43a** und **28b** lässt sich jedoch kein Affinitätsunterschied feststellen. Um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, ob das Hydroxylamin strukturell besser geeignet ist als das analoge primäre Amin, müssten noch zusätzliche Verbindungen dargestellt werden, wie z. B. die zu **30d** analoge Verbindung. Darüber hinaus müssten die Beiträge zur Desolvatation der beiden Verbindungsklassen eingehend untersucht werden. Für Endothiapepsin konnte keine entsprechende Verbesserung durch die Umwandlung des primärenamins in das Hydroxylamin erzielt werden. Für beide Grundgerüste konnten ähnlich gute Werte bestimmt werden.





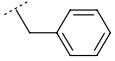

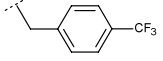



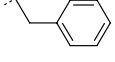

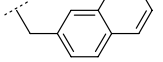

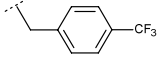

	R	X	HIV-Protease K _i /[μM]	Endothiapepsin K _i /[μM]
28a			95,5	51,6
28b			28,2	k. I.
28c			3,7	k. I.
30a			13,4	100
30b			4,0	40,0
30c			0,82	1,2
30d			0,14	0,5

Tabelle 12: Affinitätswerte der synthetisierten Verbindungen der Hydroxylamine gegenüber der HIV-Protease und Endothiapepsin. „k. I.“ steht für keine Inhibition.

Aus den Ergebnissen lässt sich somit eine sinnvolle Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR) sowohl für die Substituenten R, die die S1-Taschen besetzen sollen, als auch für

die Reste X, die in den S2-Taschen positioniert sind, ableiten. Für die Präferenz der R-Substituenten ergibt sich die folgende Reihenfolge:



Diese Reihenfolge ist bei der HIV-Protease innerhalb beider Inhibitorserien **28a-c** und **30a-d** deutlich erkennbar, und auch bei Endothiapepsin kann diese Tendenz in der Aminserie **30a-d** wiedergefunden werden. In beiden Testsystemen stellt sich ebenfalls eine klare Bevorzugung des 4-Aminophenyl-Substituenten gegenüber dem Carboxamidrest heraus. Diese Ergebnisse bestätigen die Tendenz, die ebenfalls in der Serie der primären Amine gefunden werden konnte.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse in Bezug auf die HIV-Protease im Detail betrachtet und analysiert werden. Vergleicht man die Carboxamid-Derivate **28a-c** untereinander, kann eine signifikante Steigerung der Affinität zur HIV-Protease vom *iso*-Butyl- bis zum CF₃-Benzyl-Rest für den R-Substituenten mit K_i-Werten von 96 μM auf 4 μM beobachtet werden. Die entsprechenden 4-Aminophenyl-Derivate **30a-d** zeigen ebenfalls einem sukzessiven Affinitätsgewinn von 13 μM bis auf potente 140 nM. Dieser erhebliche Gewinn um den Faktor 60 ist ausschließlich durch die Umwandlung des R-Substituenten von *iso*-Butyl in CF₃-Benzyl begründet. Eine Benzylgruppe ist im Vergleich zu einem aliphatischen Rest zusätzlich in der Lage, π-Wechselwirkungen mit aromatischen Resten aus der Aminosäurekette des Enzyms aufzubauen. Dieses Resultat verdeutlicht, wie wichtig es ist, die Spezifitätstaschen optimal zu besetzen und dort möglichst viele hydrophobe Wechselwirkungen oder gerichtete Interaktionen zu ermöglichen. Dieser Effekt wird auch bei den unterschiedlichen Resten für X deutlich. Durch den Austausch der Carboxamidgruppe an Position X gegen eine Aminfunktionalität konnte eine Affinitätssteigerung gegenüber der HIV-Protease um das 7- bis 20-fache (vgl. **28a/30a**, **28b/30b**, **28c/30d**) erreicht werden.

Eine Kristallstruktur konnte bis zur Einreichung dieser Arbeit noch nicht erhalten werden. Für eine erfolgreiche Kristallisation spielt nicht nur die Affinität des Inhibitors, sondern auch die Löslichkeit des Moleküls im wässrigen Medium eine entscheidende Rolle. Dabei gilt die Regel, dass eine Löslichkeit des Inhibitors vorliegen sollte, die um ca. den Faktor 100 über dessen K_i liegt. Demnach könnte eine schlechte Löslichkeit der Verbindungen eine einfache Kristallisation verhindern. Eine genaue Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) der synthetisierten Verbindungen zusammen mit den generierten Dockinglösungen (vgl. **Abbildung 15** und **Abbildung 16** von Seite 28-30) erlaubt es jedoch, Vermutungen über den vorliegenden Bindungsmodus

aufzustellen. In **Abbildung 44** ist ein möglicher Bindungsmodus für den affinsten Inhibitor **30d** dargestellt.

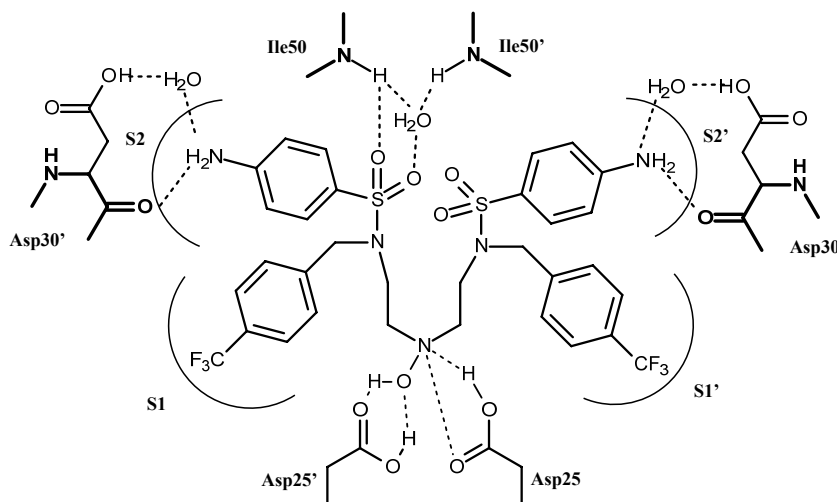
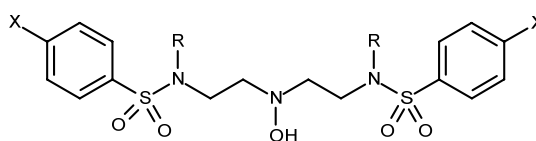


Abbildung 44: Hypothetischer Bindungsmodus der Hydroxylamine, abgeleitet von den Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR), den Dockingergebnissen sowie dem Bindungsmodus der Oligoamine.

Höchstwahrscheinlich werden die katalytischen Aspartate von dem zentralen Hydroxylamin-Motiv adressiert. Dabei wechselwirkt die Hydroxygruppe mit einem der beiden Aspartate. Das Stickstoffatom des Hydroxylamins fungiert als zusätzliche Akzeptorgruppe und wird mit in die Interaktion zum katalytischen Zentrum einbezogen. Die Flapregion wird vermutlich von einer der beiden Sulfongruppen adressiert. Im in **Abbildung 44** dargestellten hypothetischen Bindungsmodus ist eine Möglichkeit gezeigt, wie diese Interaktion mit der *Flap* aussehen könnte: Die Wechselwirkung mit den Isoleucinen 50 und 50' könnte für ein Sauerstoffatom des Sulfons direkt für das zweite Sauerstoffatom desselben wasservermittelt erfolgen. Die Taschenbesetzung für die Hydroxylamine könnte wie folgt postuliert werden: Die Affinitätswerte der Serie von Hydroxylaminen lassen vermuten, dass der CF₃-Substituent des Benzylaromaten in die S1-Tasche hineinragt und dort hydrophobe Wechselwirkungen ausbildet. Die Aminfunktionalität am Aromaten der Sulfonamidgruppe scheint zusätzlich gute Interaktionen mit dem Enzym eingehen zu können. So ist aus der Diplomarbeit von Benedikt Sammet bekannt, dass dieser Substituent in der S2-Tasche mit dem Aspartat 30 ein Wasserstoffbrückennetzwerk in der in **Abbildung 12** dargestellten Weise

eingehen kann. [79] Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Hydroxylamin-Inhibitor macht die angedeuteten Wasserstoffbrücken in der S2-Tasche sehr wahrscheinlich.



	R	X	HIV-Protease K _i /[μM]	LE [kcal·mol ⁻¹]	FQ
28a			95,5	0,14	0,51
28b			28,2	0,14	0,56
28c			3,7	0,14	0,63
30a			13,4	0,19	0,63
30b			4,0	0,18	0,67
30c			0,82	0,17	0,73
30d			0,14	0,19	0,82

Tabelle 13: Liganden-Effizienzen (LE) und „fit quality“ (FQ) für die Hydroxylamine gemessen gegen die HIV-Protease.

Mit dieser Serie gelang es aus sieben synthetisierten Verbindungen zwei einstellig mikromolare und zwei dreistellig nanomolare Inhibitoren gegen die HIV-Protease zu entwickeln. Das 2-Naphthyl-Derivat **30c** erreicht bereits eine gute Affinität mit einem K_i-Wert von 820 nM, jedoch ist das 4-CF₃-Benzyl-Derivat **30d** mit einem K_i-Wert von 140 nM ein noch vielversprechenderer Inhibitor. Dieser Inhibitor stellt somit einen guten Startpunkt zur weiteren Optimierung dieser, auf einem neuartigen Strukturelement zur Adressierung des katalytischen Zentrums basierenden Inhibitoren dar. Zur besseren Bewertung der erhaltenen Ergebnisse wurden auch hier die Liganden-Effizienzen sowie die FQs der synthetisierten Verbindungen berechnet und in **Tabelle 13** zusammengetragen. Innerhalb der Carboxamidserie (**28a-c**) ergibt sich für alle Verbindungen eine mäßige LE von 0,14 kcal·mol⁻¹, während die FQs von 0,51 beim *iso*-Butyl- über 0,56 beim Benzyl- auf 0,63 beim 4-CF₃-Benzyl-Derivat ansteigen. Der

Austausch des Carboxamids gegen die entsprechende Aminfunktionalität bewirkt im Durchschnitt eine Verbesserung der FQ um den Faktor 1,25. Auch in der Aminserie **30a-d** wird die schrittweise Verbesserung durch Einführung hydrophoberer Substituenten am Sulfonamid deutlich. Das einfachste Amin-Derivat **30a** mit *iso*-Butyl-Resten am Sulfonamid erreicht bereits eine FQ von 0,63, und im weiteren Verlauf der Serie kann dieser Wert durch Einbau des 4-CF₃-Benzylrests in Position R auf 0,82 erhöht werden. Durch eine Röntgenstrukturanalyse dieser neuartigen Inhibitoren in Komplex mit der HIV-Protease und dem dann bestimmten Bindungsmodus ließe sich schließlich überprüfen, ob der generierte Bindungsmodus aus den Dockingstudien valide war. Darüber hinaus hat, basierend auf diesen Ergebnissen, diese vielversprechende Substanzklasse sicherlich noch weiteres Optimierungspotential.

2.6 Ausblick

2.6.1 Offenkettige, primäre Amine

Die Inhibitor-Klasse der offenkettigen, primären Amine scheint nach den Erkenntnissen der Aktivitätsbestimmung für die Hemmung der HIV-Protease nicht besonders gut geeignet zu sein. Trotz einer Reihe von Strukturvariationen des Grundgerüsts (vgl. Kapitel 2.5.3.1) konnte kein Affinitätswert im einstellig mikromolaren Bereich erhalten werden. Gleiches gilt auch für die zyklischen Harnstoffe, die ebenfalls gegen die HIV-Protease keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten.

Hingegen zeigte die Klasse der primären Amine gegenüber Endothiapepsin moderate bis gute Affinitäten bis in den nanomolaren Bereich hinein. Dieses Grundgerüst könnte sicherlich durch Optimierung der Seitenketten zu hoch potenten Inhibitoren weiter entwickelt werden.

Selbstverständlich wäre die Aufklärung des Bindungsmodus mittels einer Kristallstruktur im Komplex mit dem Enzym für die Weiterentwicklung dieser Verbindungen von grundlegender Bedeutung. Allerdings ist aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Spezifitätstaschen vor und hinter der Spaltstelle zu erwarten, dass die Entwicklung unsymmetrischer Inhibitoren für Endothiapepsin zu einer weiteren Verbesserung der Aktivität führen könnte. Dazu müssten die unterschiedlichen Substituenten in den jeweiligen Spezifitätstaschen getrennt voneinander optimiert werden. Die Auswahl der Substituenten könnte mit Erhalt einer Kristallstruktur und anschließender Durchführung eines Dockingexperiments getroffen werden. Die Desymmetrisierung der offenkettigen primären Amine würde in der Generierung eines Stereozentrums am α -Kohlenstoff des primärenamins resultieren. Im Vergleich zur Darstellung achiraler Verbindungen entstünden daraus zusätzliche Herausforderungen an das Design und die Synthese der chiralen, enantiomerenreinen Verbindungen. Zunächst müsste die bevorzugte Konfiguration des Stereozentrums herausgefunden und dann eine stereoselektive Synthese entwickelt werden.

Die erste Hürde könnte mit Hilfe einer Kristallstruktur überwunden werden, da sich durch die Kristallisation eines symmetrisch substituierten Inhibitors wie z. B. **43b** die bevorzugte Geometrie bestimmen ließe. Die stereoselektive Synthese der unsymmetrisch substituierten Verbindungen **69-71** wäre für die offenkettigen, primären

Amine ebenfalls ohne größeren Aufwand möglich. Die Einführung der stereoselektiven Information könnte durch die Verwendung von D- oder L-Serin als Startmaterial verwirklicht werden. Eine optionale Syntheseroute mit L-Serin **64** als Startmaterial ist in **Abbildung 45** dargestellt.

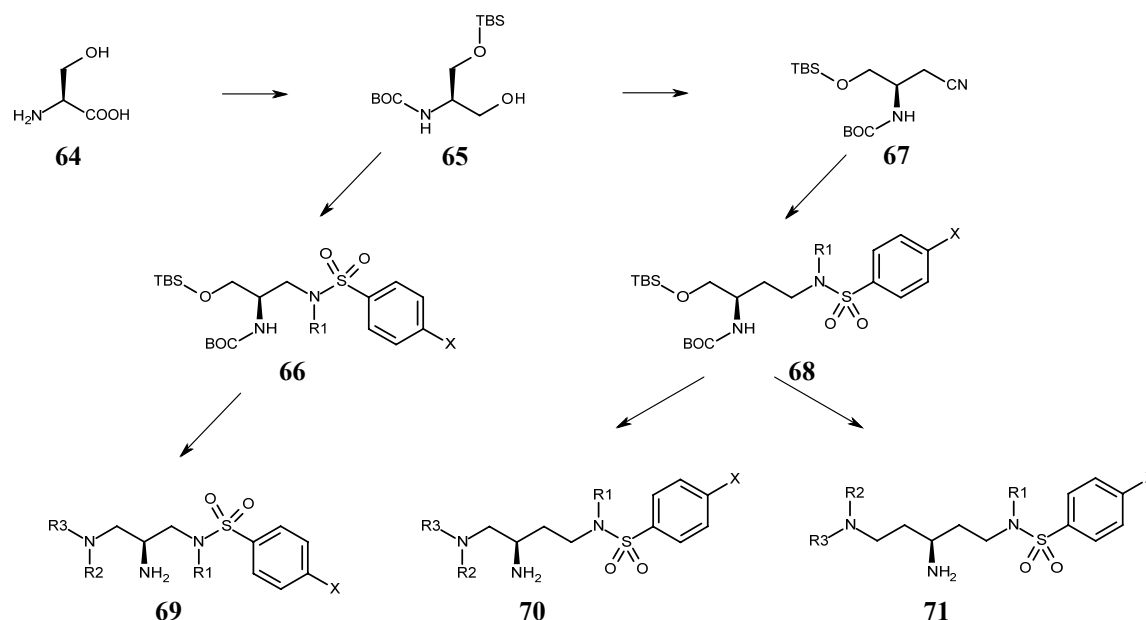


Abbildung 45: Synthesesequenz, die die stereoselektive Darstellung der unsymmetrisch substituierten primären Amin-Derivate **69-71** ermöglichen könnte. Startmaterial aus dem „chiral-pool“ wäre L-Serin **64**; optional könnte auch D-Serin als Ausgangsverbindung eingesetzt werden.

Startmaterial für die stereoselektive Synthese der unsymmetrisch substituierten, primären Amine wäre die Aminosäure Serin, die sowohl in der proteinogenen (L) als auch in der nicht proteinogenen (D) Form kommerziell erhältlich ist und je nach Bedarf eingesetzt werden kann. Die chirale Information würde folglich durch die Wahl einer Ausgangsverbindung aus dem „chiral pool“ eingeführt und während der gesamten Synthese beibehalten. Die angewendete Strategie zur Darstellung stereoselektiver Verbindungen wird dementsprechend auch als „chiral pool“-Synthese bezeichnet und könnte wie folgt aussehen:

In einem ersten Syntheseschritt kann die Aminosäure L-Serin **64** in das Boc- und TBS-geschützte-Derivat **65** umgewandelt werden. Dazu wird zunächst die Carbonsäure-Funktionalität in den entsprechenden Methylester umgewandelt und anschließend die beiden Schutzgruppen am Amin sowie am Alkohohl eingefügt. Die nachfolgende Reduktion des Esters zum Alkohol führt zur Verbindung **65**, die auf zwei

unterschiedlichen Wegen weiter umgesetzt werden könnte. Über den ersten Weg lassen sich unsymmetrische Verbindungen mit der kürzeren Linkerlänge darstellen. Dafür wird die freie Alkoholgruppe in das entsprechende Amin umgewandelt, im Anschluss daran in der gezeigten Art und Weise substituiert und so Verbindung **66** zugänglich gemacht. Nach Fertigstellung der nach obigem Schema „rechten“ Molekülhälfte kann mit der Dekoration der „linken“ Seite begonnen werden. Dies erfolgt analog zur vorgestellten Route nach Abspaltung der TBS-Schutzgruppe. Auf diese Weise können die ausgewählten Substituenten nacheinander eingeführt und somit nach finaler Abspaltung der Boc-Schutzgruppe die Verbindungen **69** stereoselektiv dargestellt werden.

Die Synthese der Verbindungen mit längerem Akzeptorabstand **70** und **71** kann auf sehr ähnlichem Weg durchgeführt werden. Ausgehend von der gemeinsamen Zwischenstufe **65** muss hier zuerst die freie Alkoholfunktionalität in das entsprechende Nitril **67** überführt werden. Dieses wird anschließend zum primären Amin reduziert. Analog zur kurzkettigen Synthese kann anschließend diese Aminfunktionalität mit den gewünschten Resten dekoriert werden. So erhält man Verbindung **68**, die eine um eine CH₂-Gruppe längere Linkerlänge aufweist als Verbindung **66** der vergleichbaren Stufe der kurzkettigen Synthese. Im nächsten Schritt kann nach Abspaltung der Alkoholschutzgruppe mit der Dekoration des „linken“ Arms begonnen werden. Hier wären zwei mögliche Variationen denkbar: Die freigesetzte Alkoholfunktionalität könnte zum einen direkt ins entsprechende Amin umgewandelt und anschließend mit Substituenten dekoriert werden. Zum anderen könnte die Variante über das Nitril zum Amin angewendet und Moleküle des Strukturtyps **71** gewonnen werden. Über die unterschiedlichen Reaktionssequenzen können somit die Verbindungen **69**, **70** und **71** mit den jeweiligen Linkerlängen von 1/1, 1/2 oder 2/2 stereoselektiv synthetisiert werden.

2.6.2 Zyklische Harnstoffe

Die Inhibitorklasse der zyklischen Harnstoffe zeigte Affinitätswerte gegen Endothiapepsin bis in den niedrigen mikromolaren Bereich. Aufgrund der Tatsache, dass die Verbindungen relativ klein sind und nur zwei Substituenten zur Adressierung der Spezifitätstaschen aufweisen, scheint weiteres Optimierungspotential gegeben zu sein. Die Rigidität des Grundgerüsts wirkt sich positiv auf die Bindungsenergie aus und kann dadurch die fehlenden Kontakte in den Bindetaschen im Vergleich zu den

analogen offenkettigen Derivaten ausgleichen. In einem nächsten Schritt könnte versucht werden, weitere Substituenten einzufügen, um die unbesetzten Spezifitätstaschen adressieren zu können. Werden unterschiedliche Substituenten in 4- und 6-Position eingeführt, ergeben sich allerdings drei Stereozentren, die in acht möglichen Stereoisomeren resultieren. Die Aufklärung des Bindungsmodus mittels Röntgenkristallographie könnte die bevorzugte Raumausrichtung der Substituenten verdeutlichen und es ließe sich daraus die benötigte Konfiguration der Stereozentren ableiten. Sind die Substituenten in 4- und 6-Position identisch, ist das α -C-Atom am primären Amin nicht mehr chiral. Dadurch sind nur noch vier mögliche Stereoisomere **72** (**Abbildung 46**) denkbar, von denen jeweils zwei identisch sind.

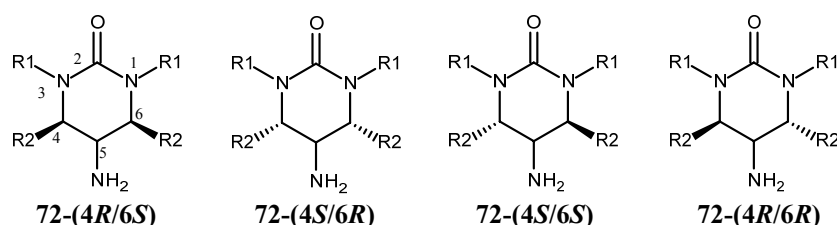


Abbildung 46: Mögliche Stereoisomere der Verbindung **72**, von denen **72-(4R/6S)** und **72-(4S/6R)** sowie **72-(4S/6S)** und **72-(4R/6R)** identisch sind; die Konfiguration wurde unter der Annahme bestimmt, dass es sich bei **R2** um einen Rest der Art $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Aromat}}$ oder eine Alkylkette handelt.

In **Abbildung 47** ist ein Beispiel für die stereoselektive Synthese einer ausgewählten Verbindung dargestellt. Die vorgeschlagene Synthese kann allerdings so abgewandelt werden, dass, falls nötig, alle möglichen Konfigurationen dargestellt werden könnten. Das Hexahydropyrimidin-2,5-dion **74** könnte in drei Schritten aus 1,3-Diamino-2-propanol **73** hergestellt werden. Im ersten Schritt werden die primären Amine in einer reduktiven Aminierung alkyliert. Nach erfolgreicher Zyklisierung wird die Hydroxygruppe zum Keton oxidiert. [133] Das Hexahydropyrimidin-2,5-dion **74** wird nun durch Umsetzung mit SAMP in ein Hydrazon-Derivat überführt. Die sich anschließende Alkylierung erfolgt aufgrund der Abschirmung durch das chirale Auxiliar nun stereoselektiv zu **75** und im zweiten Alkylierungsschritt zu **76**. [134] Im finalen Schritt könnte das Amin **72-(4S/6S)** durch Reduktion des Hydrazons zum Hydrazin und anschließende reduktive Spaltung der N-N-Bindung erhalten werden. [135, 136]

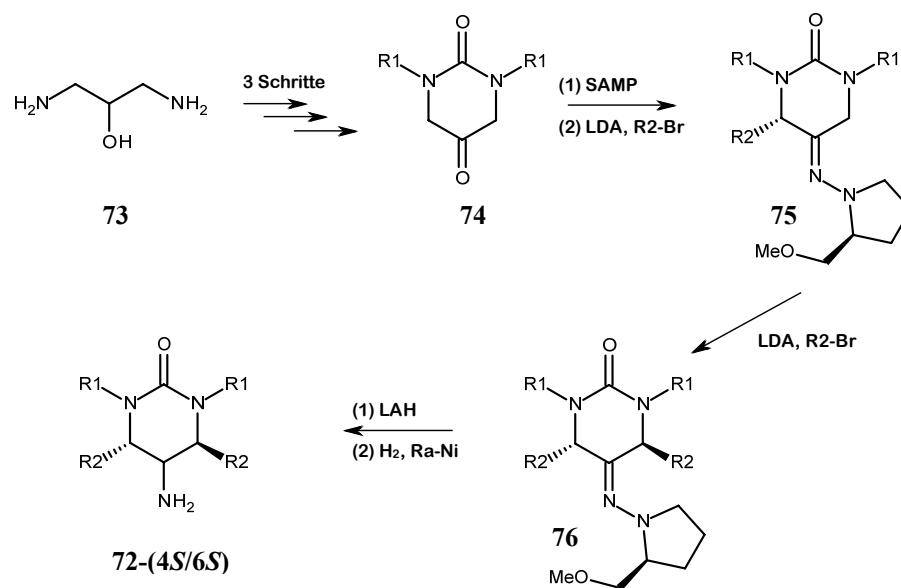


Abbildung 47: Stereoselektive Synthese der vierarmigen zyklischen Harnstoffe 72-(4S/6S) ausgehend von 1,3-Diamino-2-propanol 73; die Konfiguration wurde unter der Annahme bestimmt, dass es sich bei R2 um einen Rest der Art $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Aromat}}$ oder eine Alkylkette handelt.

Sowohl die in dieser Arbeit vorgestellten zyklischen Harnstoff-Derivate als auch die offenkettigen primären Amine zeigten gute Affinitäten gegen Endothiapepsin, nicht aber gegen die HIV-Protease. Endothiapepsin stellt ein allgemein akzeptiertes Modellsystem für andere Mitglieder der pepsinartigen Familie der Aspartat-Proteasen wie BACE1, Renin oder Cathepsin D dar. Die in Abschnitt 1.1 vorgestellten Ähnlichkeiten innerhalb der Enzymfamilie lassen vermuten, dass die beiden Inhibitor Klassen auch gegen andere Mitglieder gute Affinitäten zeigen könnten. Somit eignen sich die beiden Strukturklassen als privilegierte Strukturen zur Inhibition von Aspartat-Proteasen, die sich bezüglich Selektivität und Wirkstärke gegen einzelne Vertreter optimieren ließen.

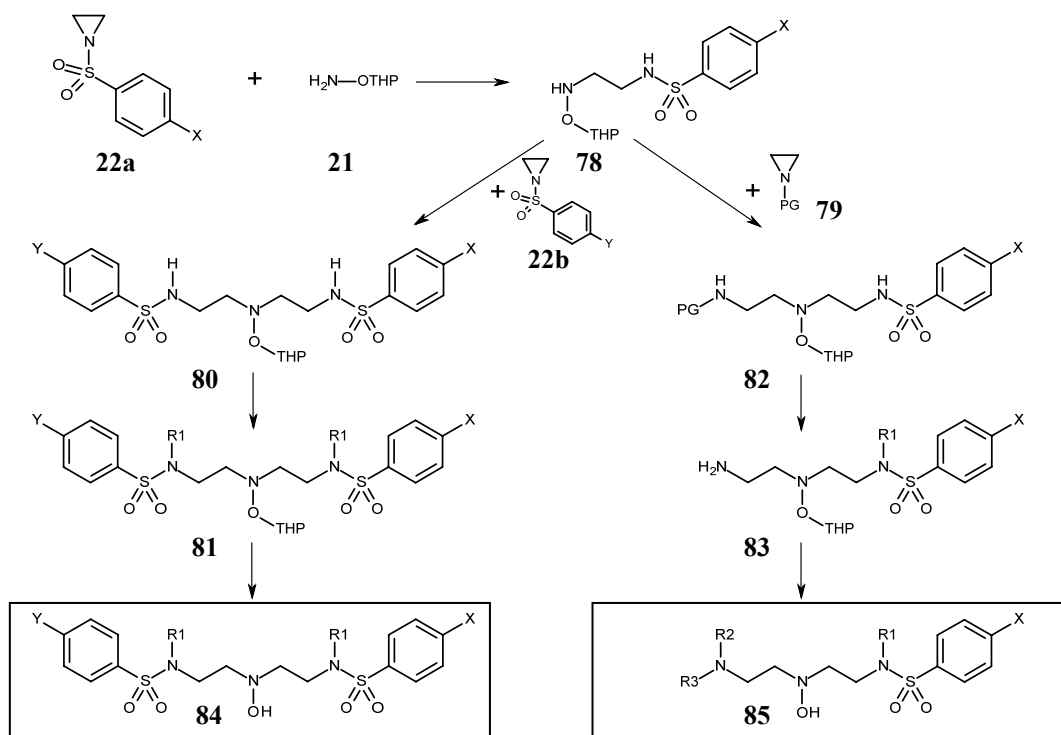
2.6.3 Hydroxylamine

Die Hydroxylamin-Derivate stellen ein aussichtsreiches neues Grundgerüst für die Inhibition der HIV-Protease dar. Strukturell ist es dem Gerüst möglich, die Substituenten so auszurichten, dass sie in die Spezifitätstaschen hineinragen und gute hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden können. Das Hydroxylamin als zentrales Strukturelement dieser Inhibitorserie stellt eine bis dato unbekannte Substanzklasse zur Adressierung der katalytischen Dyade von Aspartat-Proteasen dar. In einem nächsten

Optimierungsschritt könnte versucht werden, die Inhibitoren unter Beibehaltung der Affinität hinsichtlich ihres Molekulargewichts zu verkleinern. Für diesen Schritt ist es von essenzieller Bedeutung den genauen Bindungsmodus dieser Inhibitor-Klasse zu kennen. Erst dann können sinnvolle Variationen an den die Spezifitätstaschen adressierenden Substituenten vorgenommen werden. Bestätigt beispielsweise die Kristallstruktur die Vermutung, dass der Inhibitor unsymmetrisch an die C2-symmetrische HIV-Protease bindet, wäre eine Desymmetrisierung des Inhibitor-Moleküls eine Option sowohl zur Verkleinerung als auch zur weiteren Affinitätssteigerung. Die Synthese eines unsymmetrischen Inhibitors dieser Art ist durch leichte Abwandlungen der bestehenden Syntheseroute möglich, wird dadurch allerdings etwas umfangreicher. Eine Möglichkeit, die unsymmetrischen Verbindungen synthetisch zugänglich zu machen, ist in **Abbildung 48** dargestellt. Ein großer Vorteil dieser Inhibitor-Klasse ist die Achiralität der Verbindungen, denn selbst die unsymmetrischen Verbindungen weisen im Kerngerüst kein Stereozentrum auf. Zwar ist der Stickstoff mit drei Substituenten und einem freien Elektronenpaar sp^3 -hybridisiert und stellt bei kompletter Unterschiedlichkeit der Substituenten damit ein potenzielles Stereozentrum dar, aber dennoch lassen sich bei Raumtemperatur keine Enantiomere bei Aminen beobachten. Dies ist eine Folge des Invertierens des freien Elektronenpaares am Stickstoff, auch Stickstoff-Inversion genannt. Ausnahmen sind gespannte Ringsysteme, in denen das Stickstoffatom eine höhere Energiebarriere überwinden muss, um invertieren zu können. Im Falle der unsymmetrisch substituierten, offenkettigen Hydroxylamine sollte es sich daher um achirale Verbindungen handeln. Diese Tatsache vereinfacht und beschleunigt somit die synthetische Umsetzung im Vergleich zu einer stereoselektiven Synthese.

Im ersten Schritt könnte, wie auch bei der Synthese der symmetrischen Verbindungen, das THP-geschützte Hydroxylamin **21** in einer nukleophilen Ringöffnungsreaktion mit einem Aziridin des Typs **22a** reagieren. In dieser Synthese soll die Ringöffnung allerdings nur einfach stattfinden, um Verbindung **78** zu erhalten. Auf der Stufe der Verbindung **78** ergeben sich nun zwei unterschiedliche Synthesewege: Im ersten könnte die Zwischenstufe **78** in einer weiteren nukleophilen Ringöffnung mit einem Aziridin **22b** umgesetzt werden. Auf diese Weise wäre es möglich, voneinander abweichende Substituenten einzuführen, die zur Adressierung der S2-Tasche gedacht sind. Die Alkylierung der Sulfonamide mit entsprechenden Alkylbromiden könnte im

nachfolgenden Schritt stattfinden. Auf die beschriebene Weise wären die Hydroxylamine des Typs **84** zugänglich.



R1 = R2 = hydrophobe Substituenten; R3 = -H, hydrophobe Substituenten; PG = geeignete Schutzgruppe

Abbildung 48: Syntheseroute zur Darstellung unsymmetrisch substituierter Hydroxylamine.

Es wäre ebenfalls denkbar, das einfach alkylierte Hydroxylamin **78** mit einem *N*-geschützten Aziridin **79** zur Reaktion zu bringen und so Verbindungen des Typs **82** darzustellen, die kein zweites Sulfonamidmotiv aufweisen. Im nächsten Schritt könnte das Sulfonamid substituiert und damit die Dekoration des „rechten Arms“ abgeschlossen werden. Nachfolgende Abspaltung der Schutzgruppe (PG) würde das primäre Amin liefern, das im Anschluss über übliche Methoden, wie z. B. reduktive Aminierung, alkyliert werden könnte. Hier bestünde auch die Möglichkeit, nur einen Substituenten einzuführen und einen „dreiarmligen Inhibitor“ **85** aufzubauen.

Ein Nachteil dieser Inhibitor-Klasse stellt die große Anzahl an frei drehbaren Bindungen und damit die hohe Flexibilität des Moleküls dar. Durch die Bindung an ein Enzym wird das hoch flexible Molekül in einer Konformation fixiert. Infolgedessen verliert das Molekül einen großen Teil seiner Rotationsfreiheitsgrade, woraus ein Entropieverlust resultiert. Der Entropieverlust und die damit einhergehende Verschlechterung der Bindungsenergie könnte durch die Versteifung des Grundgerüsts verringert werden. Ob

dieser Entropiegewinn dann tatsächlich in einem Gewinn an Bindungsaffinität resultiert, ist vom Beitrag der Enthalpie abhängig. Ist der Enthalpieverlust höher als der Entropiegewinn, heben sich die beiden Beiträge auf und es ergibt sich keine Verbesserung in der Affinität. Kann allerdings der Enthalpiebeitrag konstant gehalten oder gar verbessert werden, ist eine Verbesserung des Inhibitionsvermögens möglich. Die möglichen Veränderungen der Enthalpie- und Entropiebeiträge könnten über isothermale Titrationskalorimetrie (ITC, engl. „*isothermal titration calorimetry*“) verfolgt werden. Ein Strukturvorschlag, den offenkettigen Inhibitor rigider zu machen, ist in **Abbildung 49** gezeigt.

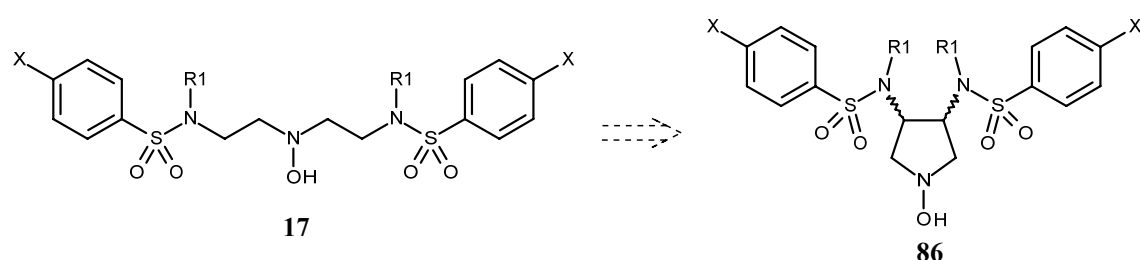


Abbildung 49: Eine Option, die offenkettigen Hydroxylamine durch Zyklisierung rigider und wahrscheinlich dadurch affiner zu machen, ist die Darstellung von Pyrrolidin-1-ol des Typs **86**.

Das dargestellte Pyrrolidin-1-ol-Grundgerüst **86** ist den Pyrrolidin-basierten Inhibitoren, die ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe bis in den niedrig nanomolaren Bereich hinein optimiert werden konnten, sehr ähnlich. Es wäre sehr spannend zu untersuchen, ob durch die zusätzliche Hydroxygruppe die Affinitäten im Vergleich zu den klassischen Pyrrolidin-Derivaten noch weiter erhöht werden können. Ein initiales Dockingexperiment wurde mit dem Pyrrolidin-1-ol-Grundgerüst **86**, dem Programm FlexX und der Kristallstruktur 1QBS (zyklischer Harnstoff) durchgeführt. Die katalytischen Aspartate waren während des Experiments protoniert, und die Möglichkeit, über ein Wassermolekül die Flapregion zu adressieren, wurde nicht berücksichtigt. Die beiden Stereozentren in 3- und 4-Position mit den drei denkbaren Konfigurationen (*RR*, *RS* bzw. *SR* und *SS*) wurden entsprechend dem Substitutionsmuster der Verbindung **86a** (**Abbildung 50 (A)**) dekoriert und für das Dockingexperiment vorbereitet. Dabei wurde eine ausgeprägte Präferenz gegenüber dem (3*R*,4*R*)-Pyrrolidin-1-ol **86a** deutlich. Die beiden anderen Ausrichtungsmöglichkeiten der Substituenten konnten vom Dockingprogramm jeweils nicht in die Bindetasche gelegt werden. In **Abbildung 50 (B-D)** sind die generierten

Dockinglösungen nach Minimierung mit MiniMuDS und Nachbewertung mit DrugScore dargestellt.

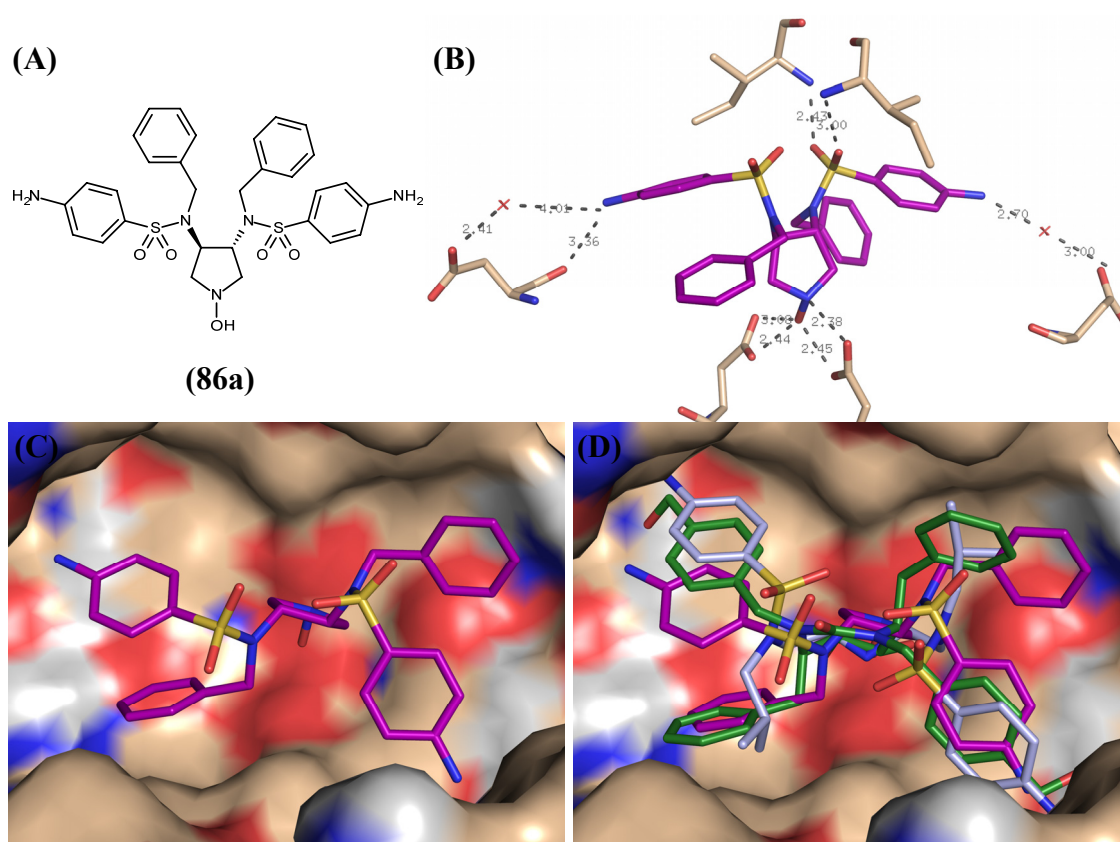


Abbildung 50: Dockinglösung des (3R,4R)-Pyrrolidin-1-ols **86a** in der Kristallstruktur 1QBS mit dem Dockingprogramm FlexX generiert, mit anschließender Minimierung mit MiniMuDS und Nachbewertung mit DrugScore; beide katalytischen Aspartate lagen protoniert vor und ein mögliches „Flap-Wasser“ wurde nicht berücksichtigt; (A) Struktur des am besten bewerteten Liganden; (B) generierter Bindungsmodus und (C) Taschenbesetzung nach Vorschlag durch das Dockingprogramm; Ligand in violett, Abstände in (B) sind in Å angegeben und Wassermoleküle als Kreuze gekennzeichnet; (D) Überlagerung der Dockinglösung in violett mit einem DMP-Liganden (1QBS) in grün und einem Oligoamin (3BGB) in hellblau.

Das Ergebnis des Dockingexperiments lässt vermuten, dass das Grundgerüst (3R,4R)-Pyrrolidin-1-ol zur Adressierung der HIV-Protease geeignet sein könnte. Das zentrale Strukturelement wird zwischen den katalytischen Aspartaten positioniert und die Taschenbesetzung scheint ebenfalls möglich zu sein.

In **Abbildung 51** sind zwei Synthesesequenzen ausgehend von (*R/R*)-Weinsäure für die Darstellung der Pyrrolidin-1-ol-Derivate **86** gezeigt. Die erste Route baut auf der Synthese von 3,4-disubstituierten Pyrrolidinen auf, die erstmals von Nagel *et al.* zur

Synthese von chiralen Phosphorliganden beschrieben wurde. [137, 138] In dieser Methode wird die Weinsäure mit Benzylamin zum zyklischen Imid umgesetzt und in einer nachfolgenden Reaktion zum Pyrrolidin reduziert. Teramoto *et al.* konnten die Zyklisierung der Weinsäure auch mit Benzyloxyamin in Xylol bei 150 °C mit einer Ausbeute von 80 % durchführen. [139] In Anlehnung an diese Synthese könnte versucht werden, das Benzyloxyamin durch das THP-geschützte Hydroxylamin **21** auszutauschen und den Ringschluss zum Imid **88** durchzuführen. Die anschließende Reduktion des Imids könnte zum (3*S*,4*S*)-Pyrrolidin-1-ol-3,4-diol **92** führen und damit die Schlüsselverbindung dieser Synthese darstellen. Die zweite Synthesesequenz geht ebenfalls von Weinsäure **87** aus, ist jedoch deutlich länger.

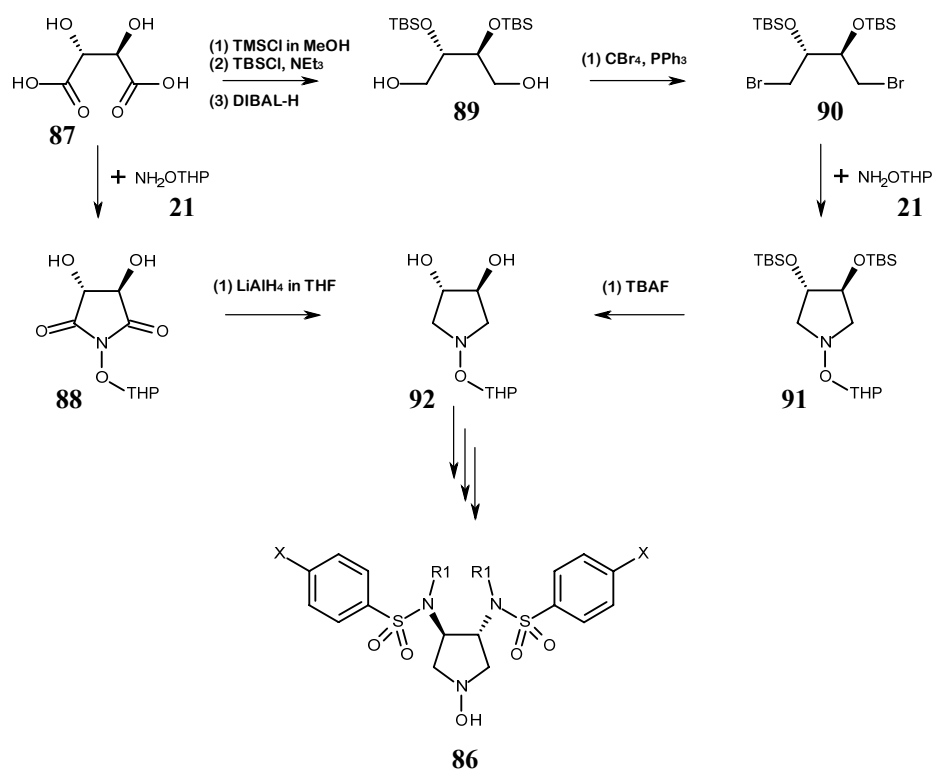


Abbildung 51: Vorschläge zur Darstellung der Pyrrolidin-1-ol-basierten Inhibitor-Klasse.

Veresterung der Carbonsäuren, Schützung der vicinalen Alkohole als TBS-Ether und anschließende Reduktion der Methylester führt zum Diol **89**. Eine nachfolgende Appel-Reaktion liefert das Dibromid **90**, welches nun zum Pyrrolidin-1-ol **91** zyklisiert werden müsste. Die Reaktion von 1,4-Dibrombutan mit Hydroxylamin-Hydrochlorid zum Pyrrolidin-1-ol ist erstmals von Procopio *et al.* 2004 erfolgreich durchgeführt worden. [140] Die Umsetzung des 2,3-substituierten 1,4-Dibrombutans **90** wurde in der

Literatur noch nicht beschrieben. Die Zyklisierung könnte sowohl mit dem dargestellten Sauerstoff-geschützten Hydroxylamin **21** als auch mit dem ungeschützten Hydroxylamin-Hydrochlorid versucht werden. Im letzteren Fall könnte die Schutzgruppe nach erfolgreicher Zyklisierung eingefügt werden. Die abschließende Entschützung der TBS-Gruppen könnte zum identischen Zwischenprodukt **92** der ersten Synthesesequenz führen. Die Dekoration der Seitenketten wäre analog zu der Weise durchführbar, die bei den offenkettigen primären Aminen vorgestellt worden ist. Im ersten Schritt müssten die Alkoholgruppen in die entsprechenden Amine umgewandelt werden, die anschließend mit geeigneten Sulfonylchloriden zum Sulfonamid reagieren könnten. Die Sulfonamide ließen sich mit diversen Bromiden alkylieren, so dass nach Abspaltung der Schutzgruppe Inhibitoren des Strukturtyps **86** erhalten werden könnten.

3 NEUARTIGE PIPERIDIN-BASIERTE INHIBITOREN

3.1 Rationales Design der Piperidin-Diester

3.1.1 Docking

Ende der 90er Jahre entwickelte *Hoffmann-La Roche Ltd.* 3,4-substituierte Piperidine als hoch potente Renin-Inhibitoren. Als Screening Hit wurde zunächst die Verbindung **93** identifiziert, die eine moderate Affinität ($IC_{50} = 50 \mu M$) gegen Renin besaß, jedoch keine Aktivität gegen die HIV-Protease, Pepsin und Cathepsin D zeigte. Optimierung des Substitutionsmusters führte zu hoch potenten Inhibitoren, von denen die affinste Verbindung auf Renin einen IC_{50} -Wert von 0,06 nM aufweist (**Abbildung 52**).

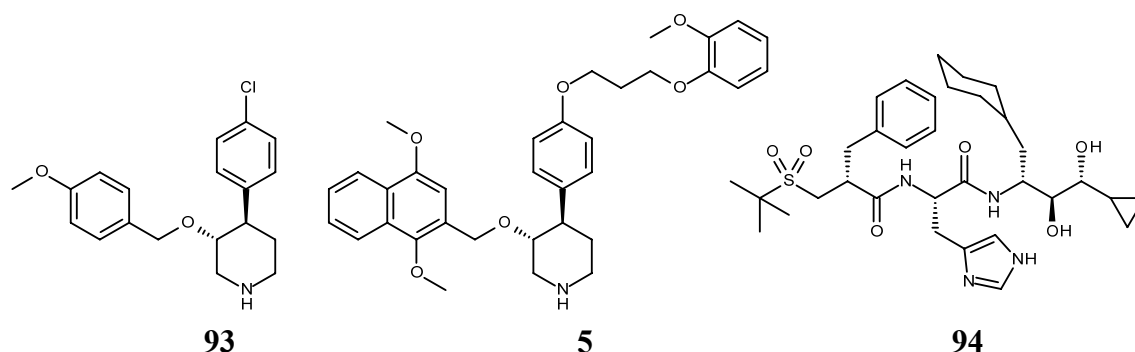


Abbildung 52: (**93**)+(5) 3,4-substituierte Piperidine als Renin-Inhibitoren, entwickelt von *Hoffmann-La Roche Ltd.*; (**93**) Screening Hit mit einem IC_{50} -Wert von 50 μM ; (**5**) hoch potenter Inhibitor ($IC_{50} = 0,06 \text{ nM}$) als Endpunkt der Leitstruktur-Optimierung; (**94**) Remikiren, ein petidischer Renin-Inhibitor.

Durch das Lösen der Kristallstruktur von **93** im Komplex mit Renin konnte der Bindungsmodus aufgeklärt und interpretiert werden. Das protonierte Stickstoffatom des Piperidinrings wird in der Nähe der katalytischen Aspartate positioniert und bildet Wasserstoffbrücken zu diesen aus. Der lipophile Chlorphenylrest erstreckt sich in Richtung der großen, hydrophoben S1/S3-Subtasche, und der Methoxybenzylrest besetzt den Raum, der in Remikiren **94** von der Sulfonylgruppe ausgefüllt wird. Das Chloratom in 4-Position am Aromaten ist jedoch nicht in der Lage, den großen Raum der S1/S3-Tasche gänzlich auszufüllen. Durch Vergrößerung dieses Substituenten konnte die Affinität deutlich erhöht werden. [56, 57] Durch Röntgenstrukturanalyse der

3,4-substituierten Piperidin-Derivate im Komplex mit Renin konnte herausgefunden werden, dass diese Inhibitoren das Enzym in einer neuartigen, offenen Konformation der Flapregion stabilisieren. Im Gegensatz zu den bekannten peptidischen Inhibitoren wird im Fall der Piperidine eine bis *dato* unbekannte, hydrophobe Tasche zugänglich, in die der 4-Phenyl-4'-Substituent hineinragen kann (**Abbildung 53 (A)**). [38]

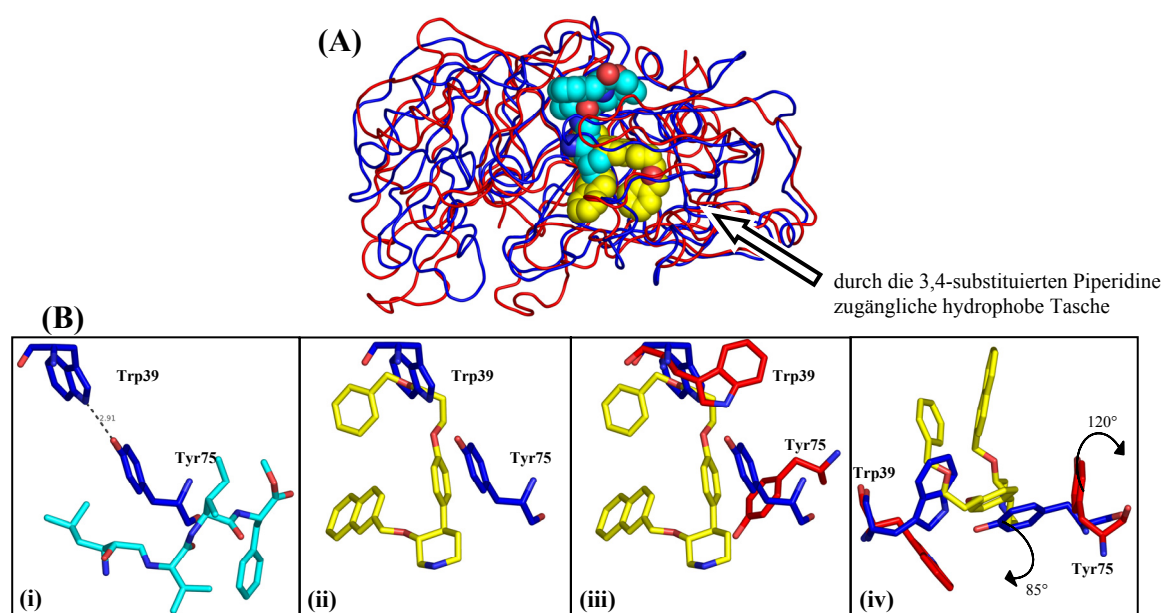


Abbildung 53: (A) Überlagerung der beobachteten Renin-Konformationen im Komplex mit einem peptidischen Inhibitor (pdb-Code: 5ER1; Ligand: cyan, Protein: blau), sowie einem 3,4-substituierten Piperidin-Liganden (pdb-Code: 1UHQ; Ligand: gelb, Protein: rot); (B) (i) konservierte Wasserstoffbrücke zwischen Tyr75 und Trp39 (2,9 Å) im Peptid-gebundenen Protein; (ii) Tyr75 und Trp39 in der nativen Enzym-Konformation verhindert den Zugang des 4-Phenyl-Substituenten (gelb) zur neuen Tasche; (iii) und (iv) Rotation von Tyr75 um 120° und Trp39 um 85°, wodurch der Zugang zur erweiterten Tasche möglich wird; Peptid-gebundene Konformation in blau, Piperidin-gebundene Konformation in rot; peptidischer Inhibitor cyan und Piperidin gelb. (eigene Darstellung in Anlehnung an [38]).

Die Konformationsänderung der Flapregion ist durch eine Drehung der Seitenkette des Tyr75 um 120° charakterisiert (**Abbildung 53 (B)**). An die Position der Tyr75-Seitenkette tritt der 4-Phenyl-Substituent, und durch die Rotation des Tyr75 wird die Wasserstoffbrücke zum Trp39 aufgebrochen, wodurch das Trp39 ebenfalls in eine abweichende Position rotiert. Diese Rotationen eröffnen den Zugang zur neuartigen hydrophoben Tasche. Aufgrund unbefriedigender pharmakokinetischer Eigenschaften wurde die Weiterentwicklung zum Arzneistoff allerdings abgebrochen. [141]

Diese Ergebnisse deuten an, dass das Piperidin eine adäquate Grundstruktur für die Adressierung des katalytischen Zentrums von Aspartat-Proteasen der Familie A1 ist. Allerdings scheint die Anordnung der Substituenten in 3- und 4-Position am Piperidinring für die Inhibition der HIV-Protease (Familie A2) nicht geeignet zu sein. Sowohl die C2-Symmetrie der HIV-Protease als auch die Erkenntnisse aus Arbeiten an Pyrrolidin-basierten Liganden, die ebenfalls in unserem Arbeitskreis von Andreas Blum und Nina Klee durchgeführt wurden, lassen vermuten, dass eine Substitution in 3- und 5-Position für die Besetzung der Spezifitätstaschen durch die Substituenten sinnvoller wäre. In **Abbildung 54** ist eine Überlagerung eines 3,4-substituierten Piperidins des Typs **93** mit einem 3,5-substituierten Piperidin der Struktur **96** gezeigt. Dabei wird sofort deutlich, dass der Substituent in 4-Position mit der Oberfläche des Enzyms in der Flapregion zusammenstoßen würde, wenn das Stickstoffatom des Piperidins zwischen den katalytischen Aspartaten positioniert wäre. Eine Stabilisierung einer offenen Flapkonformation wie bei Renin ist bei der HIV-Protease nicht wahrscheinlich, da die Flapregion der HIV-Protease große Unterschiede zur der des Renins aufweist.

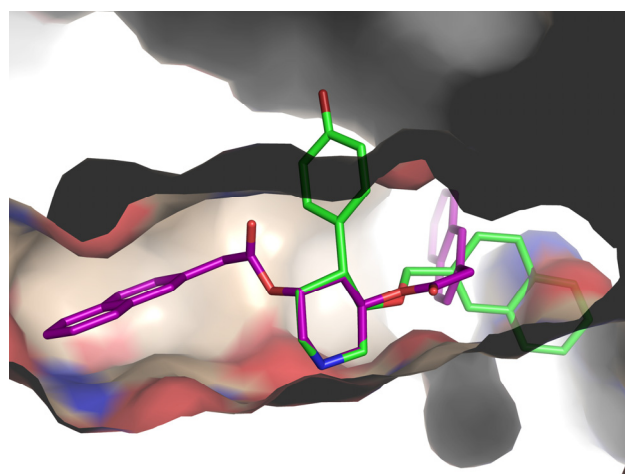


Abbildung 54: Überlagerung des Piperidins **93** (grün) mit einem 3,5-substituierten Piperidin des Typs **96** (violett) im Komplex mit der HIV-Protease (pdb-Code: 2QNN).

In Anlehnung an die Entwicklung der Pyrrolidin-Diester durch Jark Böttcher und Andreas Blum sollten daher im ersten Syntheszyklus ebenfalls symmetrische Ester **96** dargestellt werden. [142] Der Vorteil liegt in der einfachen synthetischen Zugänglichkeit der symmetrischen Piperidin-Derivate. Jedoch besitzen diese Verbindungen nur zwei Substituenten, die für die Besetzung der Spezifitätstaschen herangezogen werden können. Da es sich bei dem Piperidin-Grundgerüst um eine neuartige Strukturklasse für die Inhibition der HIV-Protease handelt, war zunächst

abzuklären, ob sich das Piperidingerüst für die Entwicklung neuartiger HIV-Protease-Inhibitoren eignet. Die Piperidin-Diester **96** schienen für diesen Zweck angemessene Ausgangsverbindungen zu sein. In einem ersten Dockingexperiment wurden alle möglichen Stereoisomere (*R/R*, *R/S*, *S/S*) der 3,5-substituierten Piperidine getestet, um so eine Aussage über die Geometrie der Substituenten treffen zu können. Basierend auf den Dockinglösungen erscheint die *R/R*-Konfiguration als eine geeignete Anordnung, um die Subtaschen adressieren zu können. Über ein zweites Dockingexperiment wurden die aussichtsreichsten Reste R für die Besetzung der Spezifitätstaschen ausgewählt. Insgesamt 30 Carbonsäuren und Carbonsäurechloride, die über die institutsinterne Chemikaliendatenbank verfügbar waren, wurden mit dem Piperidin-Grundgerüst **95** zu Verbindungen des Typs **96** *in silico* zusammengesetzt. Diese Verbindungen wurden mit Hilfe des Programms Corina in dreidimensionale Strukturen umgewandelt und anschließend mit MOE minimiert. Die so aufbereiteten Strukturen wurden mit dem Programm FlexX unter Standardbedingungen in die Bindetasche der HIV-Protease (2QNN und 3BGB) gedockt.

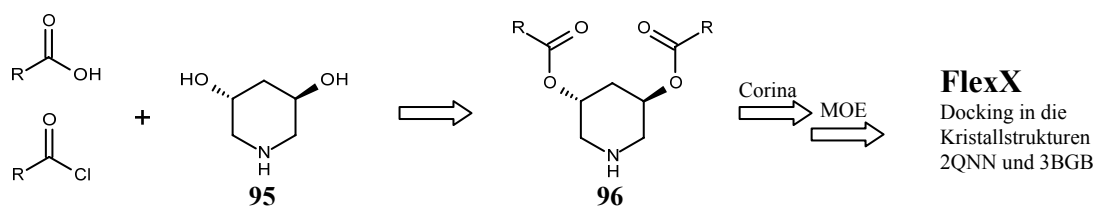


Abbildung 55: Vorbereitung der Strukturen für das Dockingexperiment; dazu wurden alle „inhouse“ verfügbaren Säuren und Säurechloride mit dem Diol **95** zu Verbindungen der Art **96** zusammengesetzt; nach Anwendung der Programme Corina und MOE wurden die Strukturen mit FlexX gedockt.

Das Dockingexperiment wurde mit zwei verschiedenen Kristallstrukturen durchgeführt. In der Kristallstruktur 2QNN ist das „*Flap*-Wasser“, das normalerweise zwischen den Isoleucinen 50 und 50' lokalisiert ist, durch den Inhibitor verdrängt. Hingegen ist das „*Flap*-Wasser“ in der Kristallstruktur 3BGB trotz gebundenem Inhibitor zwischen den Isoleucinen positioniert und kann im Dockingexperiment mit in die Berechnungen einbezogen werden. In beiden Dockingexperimenten lagen die Aspartate des katalytischen Zentrums deprotoniert vor. Darüber hinaus waren die Inhibitoren am Piperidin-Stickstoff protoniert. In **Abbildung 56** ist eine Dockinglösung des 2-Naphthyl-Derivats im Komplex mit der HIV-Protease (pdb-Code: 2QNN) dargestellt. Das protonierte Stickstoffatom kommt zwischen den beiden katalytischen Aspartaten 25 und 25' zu liegen und kann auf diese Weise Wasserstoffbrücken zu diesen ausbilden.

Die Flapregion wird über eine Wechselwirkung des Sauerstoffatoms der Carbonylgruppe zum Isoleucin 50' adressiert. Die beiden Substituenten besetzen die Spezifitätstaschen. Dabei besetzt der Rest des axialen Substituenten die S2-Tasche und der Rest des äquatorialen die S1'-Tasche.

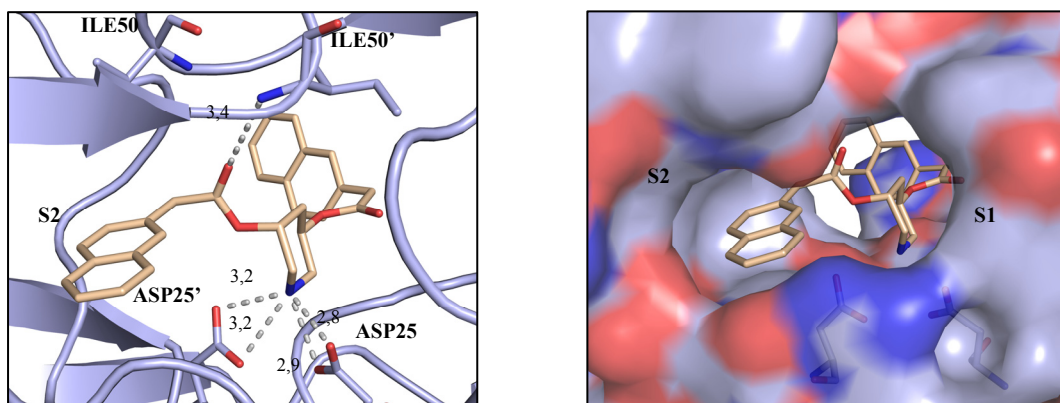


Abbildung 56: Dockinglösung für den Piperidin-Diester mit 2-Naphthylsubstituenten in einer Kristallstruktur der HIV-Protease (pdb: 2QNN); (A) dargestellt ist der Bindungsmodus mit den Hauptwechselwirkungen. Das Stickstoffatom des Piperidinrings adressiert die katalytischen Aspartate 25 und 25' und das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe des axialen Substituenten das Isoleucin 50' der Flapregion. (B) Taschenbesetzung der Substituenten des Inhibitors; der axiale 2-Naphthylrest kommt in der hydrophoben Umgebung der S2-Tasche zu liegen; der zweite Substituent besetzt die S1'-Tasche, und die S1- und S2'-Taschen bleiben unbesetzt.

Die Dockinglösungen aller anderen Verbindungen zeigten ähnliche Bindungsmodi. Aus diesem Grund wird hier darauf verzichtet, weitere Beispiele aufzuführen. Die Auswahl der Carbonsäuren bzw. Carbonsäurechloride erfolgte durch visuelle Begutachtung der Dockinglösungen.

3.1.2 Syntheseplanung und Durchführung

In **Abbildung 57** ist die Retro-Synthese der symmetrischen Piperidin-Diester am Beispiel des Benzyl-Derivats **104** dargestellt. Die Diester sind über eine Kupplung des Diols **55** mit ausgewählten Carbonsäuren oder Carbonsäurechloriden zugänglich. Eine Synthese des *N*-Boc-geschützten Diols **55** war noch nicht literaturbekannt, die der *N*-Benzyl-geschützten Verbindung ist beschrieben. [143-145] Dieses Diol kann über eine fünfstufige Sequenz stereoselektiv aus *trans*-4-Hydroxy-L-prolin erhalten werden. Die Schutzgruppe dieser Verbindung kann dann mittels einer Umschützungsreaktion in

einem Schritt von Benzyl in Boc umgewandelt werden. [65] Kovacková *et al.* veröffentlichten im Februar 2011 die Synthese des Boc-geschützten Diols **55**, in der auf ähnliche Weise die Umschüttung erfolgt. [146]

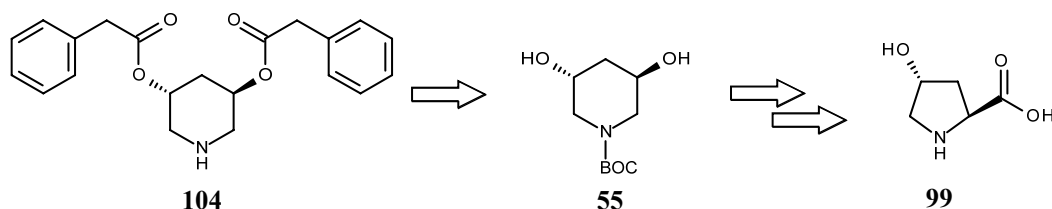


Abbildung 57: Retro-Synthese der Piperidin-Diester.

In **Abbildung 58** ist die Synthesesequenz zur Darstellung der zentralen Zwischenstufe **103** im Detail dargestellt. Die Synthese des *N*-Benzyl-geschützten Derivats **102** wurde in Anlehnung an die bereits veröffentlichte Route von Cossy *et al.* durchgeführt. [145] Startmaterial dieser Reaktion ist *trans*-4-Hydroxy-L-Prolin **99**, das im ersten Schritt in den entsprechenden Methylester umgewandelt wird. Anschließend werden sowohl der Stickstoff des Pyrrolidins mit der Benzylgruppe als auch die Alkoholfunktionalität mit der TBS-Gruppe geschützt. Die Reduktion des Methylesters im vierten Schritt der Synthese wurde nicht mit Lithiumaluminiumhydrid (LAH) wie in der publizierten Vorschrift durchgeführt, sondern mit Diisobutylaluminiumhydrid (Dibal-H). LAH wurde durch Dibal-H ersetzt, weil es einfacher zu handhaben ist und eine vereinfachte Aufarbeitung möglich machte.

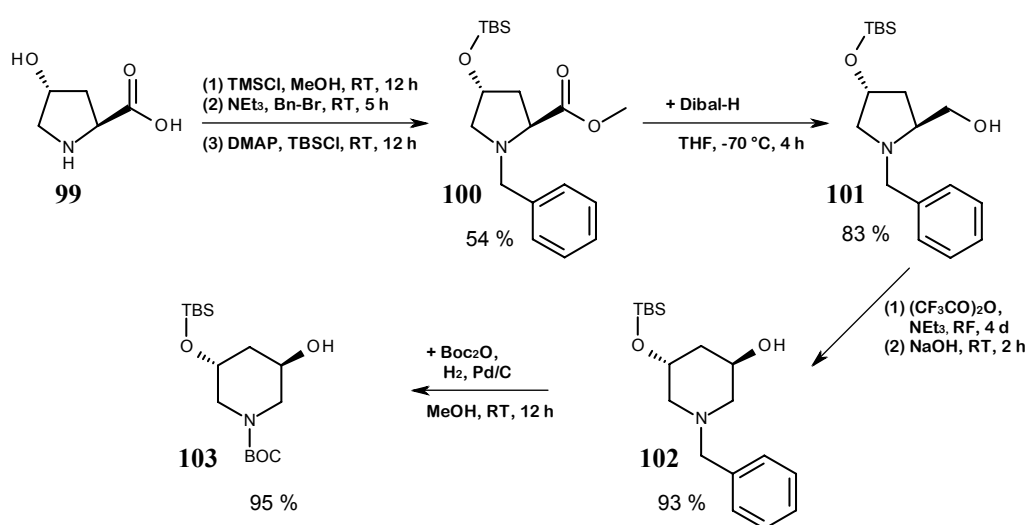


Abbildung 58: Syntheseroute zur Darstellung der Verbindung **103**.

Im nachfolgenden Schritt findet die Ringerweiterung unter Beibehaltung der Stereochemie zum Piperidin **102** statt. Um die Abspaltung der Schutzgruppe im finalen Schritt der Syntheseroute zu gewährleisten, wurde der Benzylrest am Piperidin-Stickstoff in einer H₂-Atmosphäre abgespalten und simultan durch die Boc-Gruppe ersetzt. Mittels dieser sechsstufigen Syntheseroute kann das gewünschte Piperidin **103** mit *R/R*-Konfiguration aus *trans*-4-Hydroxy-L-Prolin **99** in einer Gesamtausbeute von 40 % erhalten werden. Als Schlüsselreaktion dieser Route soll die Ringerweiterung vom Pyrrolidin zum Piperidin etwas genauer betrachtet werden. Der postulierte Mechanismus für den Ablauf der Ringerweiterung ist in **Abbildung 59** gezeigt. [143] Es wird angenommen, dass Pyrrolidin-2-methyl-Derivate **A**, mit einer nucleofugen Abgangsgruppe (EWG; engl. *electron withdrawing groups*) versehen, zu reaktiven Aziridinium-Salzen des Typs **B** reagieren können. Das Aziridinium-Ion wird anschließend durch einen nukleophilen Angriff der zuvor abgespaltenen Gruppe (OEWG) wieder geöffnet. Greift das Nukleophil am C2-Atom des Pyrrolidinrings an, öffnet sich das Aziridinium-Ion unter Ausbildung eines Sechsrings, dem Piperidin **C**. Es ist natürlich auch denkbar, dass das Aziridinium-Ion unter Rückbildung der Ausgangsverbindung **A** durch Angriff am C2' geöffnet werden kann. Damit müsste die Reaktion in einem Gleichgewicht vorliegen. Dieses kann aufgrund von Unterschieden in der Ringspannung und durch thermodynamische Kontrolle der Reaktion auf die Seite des Piperidins **C** verschoben werden. [144] Welcher Substituent für R ausgewählt wird, ist für den Verlauf der Reaktion essenziell. Es konnte gezeigt werden, dass ein aliphatischer oder benzylicher Rest an dieser Position die Reaktion begünstigt. Ist der Ringstickstoff beispielsweise schon vor der Ringerweiterung als Carbamat geschützt, läuft die Reaktion zum Piperidin nicht ab, da das geschützte Stickstoffatom nicht mehr nukleophil genug ist, um zum Aziridinium-Ion reagieren zu können. Aus diesem Grund wird zu Beginn der Synthesesequenz zuerst die Benzylgruppe eingefügt, um diese dann nach der Ringerweiterung durch die Boc-Gruppe zu ersetzen. Die Boc-Gruppe wird der Benzylgruppe vorgezogen, da sie sich im finalen Schritt der Synthese einfacher und sicherer wieder abspalten lässt.

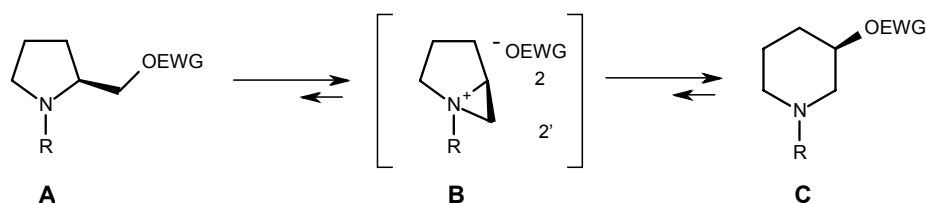


Abbildung 59: Postulierter Mechanismus für die Ringerweiterung vom Pyrrolidin zum Piperidin unter Retention des Stereozentrums.

In **Abbildung 60** sind die abschließenden Reaktionsschritte bis zur gewünschten Zielverbindung dargestellt. Da zuerst eine Serie von symmetrischen Inhibitoren synthetisiert werden sollte, konnte die TBS-Schutzgruppe an dieser Stelle abgespalten und das symmetrische *R/R*-Diol **55** erhalten werden. Im nächsten Schritt fand dann die Derivatisierung über eine gewöhnliche Veresterungsreaktion mit Carbonsäuren bzw. Carbonsäurechloriden statt. Die Carbonsäuren wurden zunächst durch das Kupplungsreagenz EDC aktiviert, um dadurch die Umsetzung mit dem Alkohol zu erleichtern. Der gewünschte Inhibitor wurde nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit HCl in Diethylether in Form seines Hydrochlorids gewonnen.

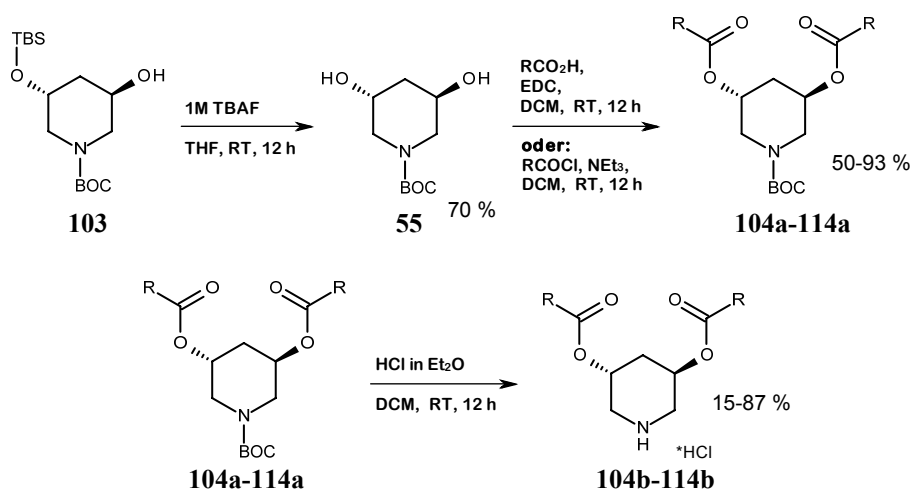


Abbildung 60: Synthese der Piperidin-Diester über drei Stufen ausgehend von Verbindung **103**.

Ein Vorteil dieser Syntheseroute ist die Möglichkeit, auch unsymmetrisch substituierte Inhibitoren darstellen zu können, denn in Verbindung **103** liegt bereits eine der beiden Hydroxygruppen geschützt vor. Dadurch ist es möglich, zuerst einen Rest am ungeschützten Alkohol einzuführen und nach Abspaltung der TBS-Gruppe einen zweiten Rest mit der zweiten Hydroxyfunktionalität zu verknüpfen. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Piperidin-Diester inklusive Ausbeuten aufgeführt, die durch die vorgestellte Synthese dargestellt werden konnten.

*HCl

	R	Ausbeute Veresterung	Ausbeute Entschützung
104b		70 % ^[a]	95 %
105b		78 %	80 %
106b		90 %	73 %
107b		82 %	60 % ^[c]
108b		93 %	15 %
109b		30 % ^[b]	71 %
110b		52 %	87 %
111b		52 %	77 %
112b		91 %	83 %
113b		87 %	87 %
114b		31 %	97 %

Tabelle 14: Verbindungen der Piperidin-Diester-Serie mit Ausbeuten der Veresterung verschiedener Carbonsäuren mittels EDC und abschließender Abspaltung der Schutzgruppe; ^[a] Säurechlorid zur Veresterung verwendet; ^[b] nur einfache Veresterung möglich; ^[c] als freies Amin isoliert.

Alle Kupplungen zum Diester konnten mit moderaten bis sehr guten Ausbeuten von 50-90 % durchgeführt werden. Ausnahme ist die Reaktion zu Verbindung **109a**. Die Kupplungsreaktion des Diols **55** mit der Biphenyl-4-carbonsäure gelang trotz Variation der Reaktionsbedingungen nur einfach und ergab Verbindung **109a** mit einer freien Alkoholfunktionalität in 5-Position des Piperidinrings. Die deutlich geringere Reaktivität der zweiten Hydroxygruppe ist wahrscheinlich auf die sterische Hinderung des entstandenen Monoesters zurückzuführen. Im Vergleich zu den anderen Resten R besitzt die Biphenyl-4-carbonsäure keine CH₂-Gruppe zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Aromaten. Damit steht die Carbonylgruppe in direkter Konjugation mit dem aromatischen Ring und eine planare Anordnung sollte energetisch bevorzugt sein. Dadurch ergibt sich ein relativ rigider Aufbau, wohingegen die anderen Verbindungen dort durch die zusätzliche CH₂-Gruppe eine frei drehbare Bindung aufweisen und damit wesentlich flexibler sind.

Alle synthetisierten Verbindungen wurden gegen HIV-Protease und Endothiapepsin im Enzym-Aktivitätsassay vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen werden in Abschnitt 3.3 vorgestellt und diskutiert.

3.2 Rationales Design der dreiarmigen Piperidin-Derivate

3.2.1 Docking

Im nächsten Schritt sollte versucht werden, die Affinität der zweiarmigen Piperidin-Derivate **96** zum Enzym durch die Einführung eines dritten Substituenten weiter zu erhöhen. Chemisch ist dies durch die Umwandlung der Hydroxyfunktionalitäten in Aminogruppen und anschließende Alkylierung möglich. Eine schematische Darstellung dieser Route ist in **Abbildung 61** gezeigt.

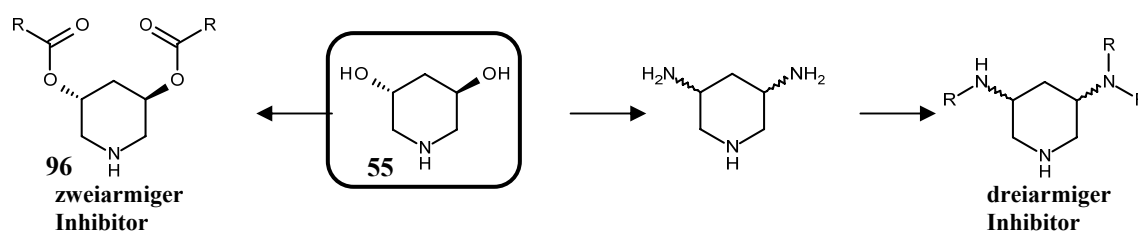


Abbildung 61: Ausgehend von der Diol-Zwischenstufe **55** der zweiarmigen Inhibitoren sollten dreiarmige Verbindungen dargestellt werden; eine mögliche Umsetzung ist hier schematisch dargestellt. Die Umwandlung der Sauerstoffatome in 3- und 5-Position in Stickstoffatome ermöglicht die Einführung weiterer Substituenten.

Auf die gezeigte Weise ist es möglich, an einer Aminfunktionalität zwei Substituenten und an der anderen einen Substituenten anzufügen. Aus vorhergehenden Arbeiten von Andreas Blum am Pyrrolidin-Grundgerüst hat sich gezeigt, dass ein Sulfon eine geeignete Akzeptorgruppe darstellt, um Wechselwirkungen zu beiden Isoleucinen der Flapregion aufzubauen. Außerdem stellte sich heraus, dass ein Carboxamid, welches in *p*-Stellung zum Sulfonamid angeordnet ist, einen positiven Beitrag zur Bindungsaffinität leisten kann. Bei optimaler Positionierung ist es in der Lage, in der S2-Tasche mit den Aspartaten 29 und/oder 30 Wasserstoffbrücken auszubilden. Daraus resultierend wurde das beschriebene Strukturelement, das die S2-Tasche adressieren soll, von den Pyrrolidin-basierten Liganden übernommen. Damit war ein Substituent vorgegeben, und über die Dockingexperimente sollte nun die bevorzugte Konfiguration der beiden Stereozentren bestimmt werden. Im Anschluss daran sollten Vorschläge für die beiden variablen Positionen generiert werden.

Durch die Synthese des Piperidinrings, die im Detail in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde, ist es möglich, einzelne Stereoisomere gezielt darzustellen. In einem ersten

Dockingexperiment sollte die bevorzugte Ausrichtung der Substituenten analysiert und die daraus resultierenden Konfigurationen der Stereozentren bestimmt werden. In **Abbildung 62 (A)** ist eine Übersicht der vorgeschlagenen Taschenbesetzung der HIV-Protease durch einen dreiarmligen Inhibitor gezeigt. Der Ligand ist in beiden variablen Positionen mit benzyllischen Substituenten dekoriert und stellt damit eine sehr einfache Verbindung dar. In der Darstellung wird deutlich, dass die Verbindung in der vorliegenden Konfiguration die Substituenten so ausrichtet, dass die Spezifitätstaschen des Enzyms gut besetzt werden können. Der zweiarmlige Substituent ordnet sich äquatorial an und erstreckt sich mit dem Carboxamid-Rest in die S2'-Tasche. Der am Sulfonamid positionierte Benzylrest ragt in die benachbarte hydrophobe S1-Tasche. Der dritte Substituent, der mit dem sekundären Amin verknüpft ist, ist axial ausgerichtet und adressiert die ebenfalls hydrophobe S1'-Tasche. Die bevorzugte Konfiguration der Stereozentren wurde somit als *S/S* identifiziert und sollte auf diese Weise die beschriebene Taschenbesetzung ermöglichen, wobei die S2-Tasche unbesetzt bleibt. In **Abbildung 62 (B)** ist der generierte Bindungsmodus für den Liganden dargestellt.

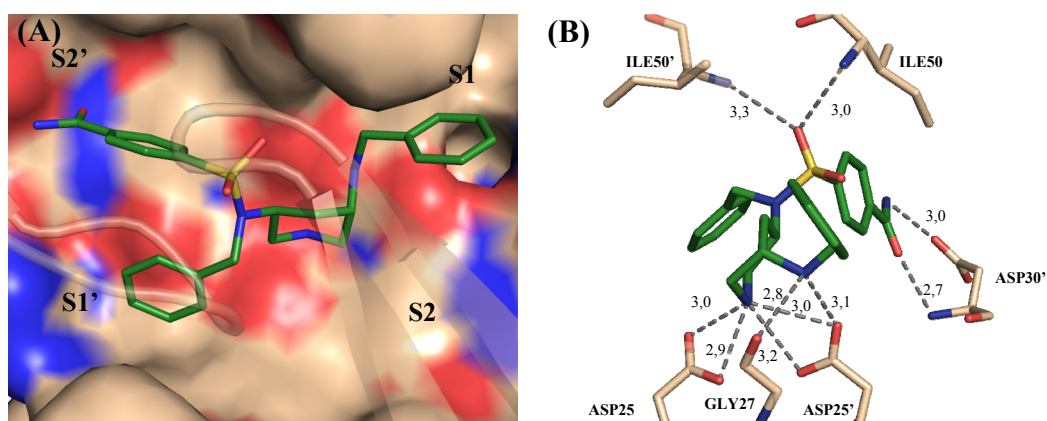


Abbildung 62: Generierter Bindungsmodus der dreiarmligen Piperidin-Derivate durch das Dockingprogramm FlexX; **(A)** mögliche Taschenbesetzung durch die Substituenten des dreiarmligen Liganden; **(B)** Bindungsmodus der Dockinglösung, gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrücken dar.

In dieser modellierten Bindungsgeometrie kommt der protonierte Stickstoff des Piperidinrings zwischen den Aspartaten 25 und 25' zu liegen und ist in der Lage, mit beiden Aspartaten Wasserstoffbrücken einzugehen. Das Sulfonamid adressiert über ein Sauerstoffatom unter Verdrängung des „Flap-Wassers“ beide Isoleucine der Flapregion. Das exozyklische, sekundäre Amin liegt ebenfalls protoniert vor und interagiert mit einem Aspartat (Asp25') sowie mit dem Carbonylsauerstoff der Amidbindung von Glycin 27. Das Carboxamid in der S2'-Tasche ist in direkter Nähe zum Aspartat 30' positioniert und auf diese Weise befähigt, gerichtete Wechselwirkungen mit diesem

einzugehen. Die Aromaten bilden in den Spezifitätstaschen S1 und S1' hydrophobe Wechselwirkungen aus.

Nachdem die Konfiguration der Stereozentren festgelegt war, wurde ein kombinatorisches Docking durchgeführt, um geeignete Reste zur Adressierung der S1- und S1'-Tasche zu ermitteln. Dazu wurde mit Hilfe der *Clib* von FlexX das Grundgerüst an der Position R1 mit 114 Bromiden und an Position R2 mit 36 Aldehyden bzw. 426 Alkoholen aus einer „inhouse“-Bibliothek kombiniert. Von über 50.000 theoretisch möglichen Verbindungen wurden nach einem Molekulargewichtsfiter (> 700 g/mol) 3.626 generierte Verbindungen mit Corina und MOE in dreidimensionale, minimierte Strukturen überführt, die anschließend mittels FlexX in die Bindetasche der HIV-Protease (pdb-Code: 2QNN) eingepasst wurden.

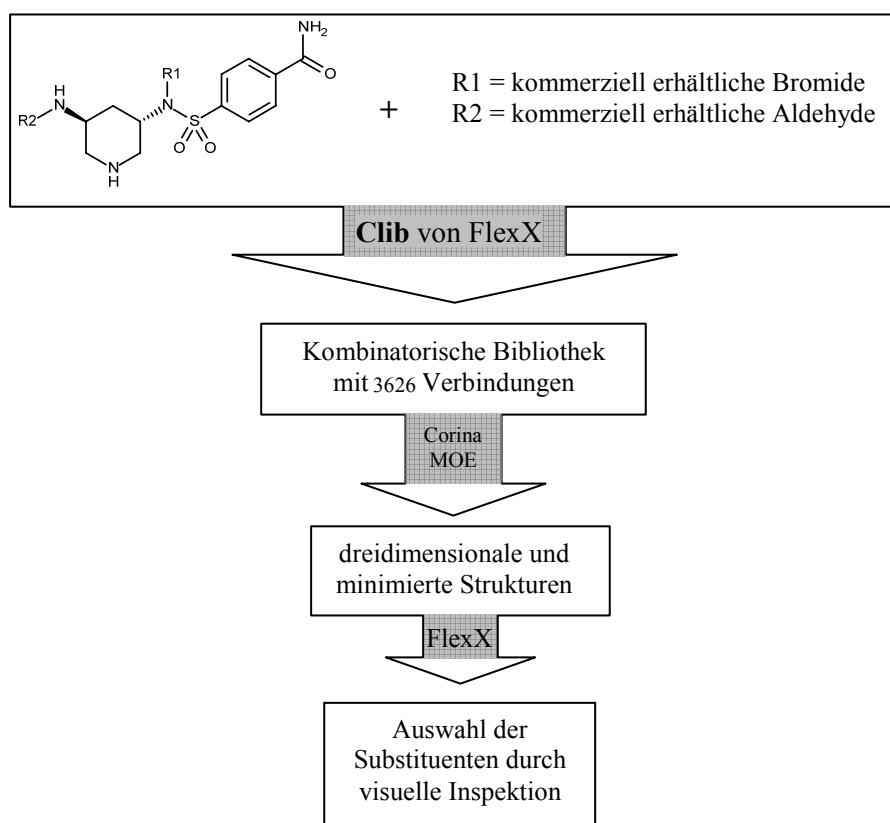


Abbildung 63: Schematische Darstellung zur Vorbereitung der Docking-Bibliothek für die dreiarmigen Piperidin-Derivate.

Die erzeugten Dockinglösungen wurden mit MiniMuDS minimiert und anschließend mit DrugScore nachbewertet. Aus den besten 100 Dockinglösungen wurden durch visuelle Begutachtung die interessantesten und verheißungsvollsten Substituenten für die Reste R1 und R2 ausgewählt, die in **Tabelle 15** zusammengetragen sind.

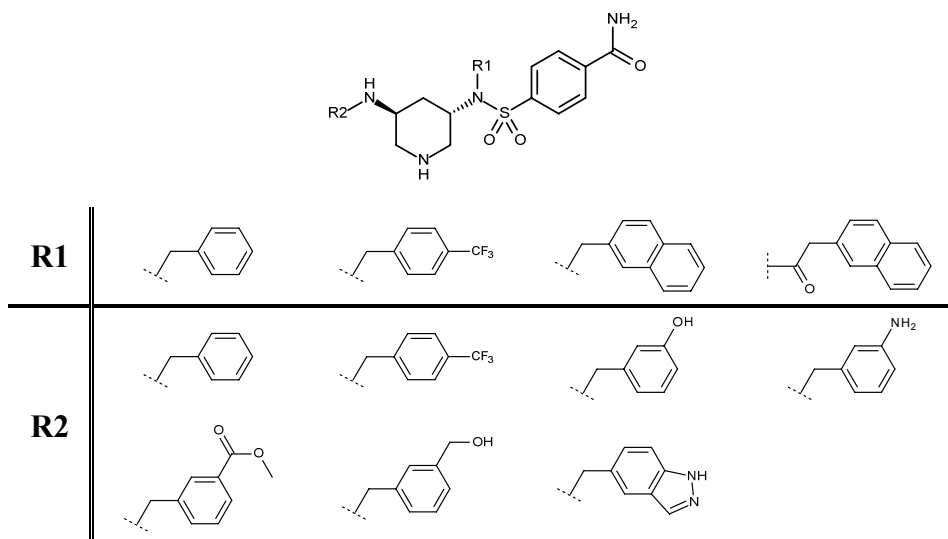


Tabelle 15: Aufgelistet sind die Substituenten für R1 und R2, die durch das beschriebene Dockingexperiment für die synthetische Umsetzung ausgewählt wurden.

Die vom Dockingprogramm FlexX generierten Bindungsmodi für die Verbindungen mit den ausgewählten Substituenten sind alle ähnlich in Bezug auf die Taschenbesetzung und die Hauptinteraktionen des Grundgerüsts mit dem Enzym, wie die Überlagerung der fünf besten Dockinglösungen der Naphthyl-Derivate in **Abbildung 64 (A)** verdeutlicht. Unterschiede können in den verschiedenen Wechselwirkungen der Substituenten in 5-Position des Piperidinrings erkannt werden, die teilweise in der S1-, aber auch in der S2-Tasche zu liegen kommen.

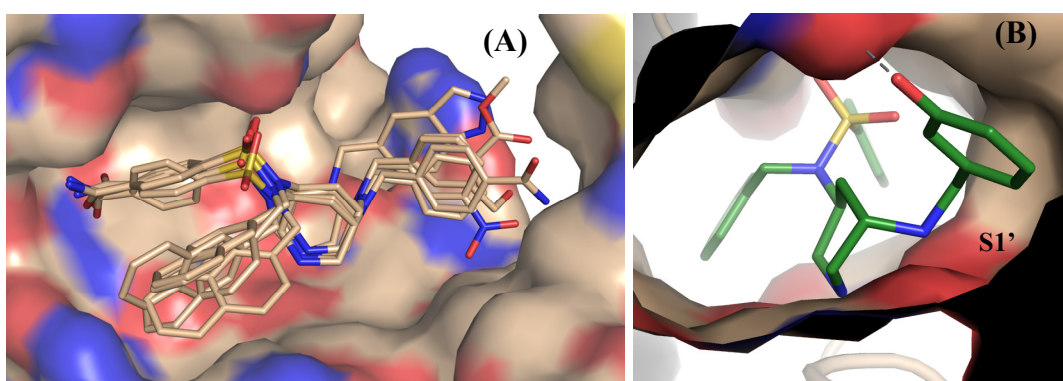


Abbildung 64: (A) Überlagerung der fünf besten Dockinglösungen für die dreiarmligen Piperidin-Derivate im Komplex mit der HIV-Protease (pdb-Code: 2QNN); (B) Abgebildet ist eine Dockinglösung des dreiarmligen Piperidin-Derivats mit einem 3-Hydroxybenzyl-Substituenten in der S1'-Tasche; die Hydroxygruppe ist in der Lage, mit dem Carbonylsauerstoff des Glycins 48' eine Wasserstoffbrücke auszubilden.

Als ein Beispiel soll der 3-Hydroxyrest, der in der S1' Tasche des Enzyms zu liegen kommt, betrachtet werden (**Abbildung 64 (B)**). Die Hydroxygruppe in *m*-Position bildet zum Carbonylsauerstoff der Amidbindung der Aminosäure Glycin 48' eine Wasserstoffbrücke aus. Diese Wechselwirkung innerhalb der Spezifitätstasche sollte die Bindungsaffinität zum Enzym zusätzlich erhöhen.

3.2.2 Syntheseplanung und Durchführung

Für diese Klasse von Inhibitoren sind drei Design-Zyklen zur Verbesserung der Aktivität gegenüber dem Zielenzym durchgeführt worden. Auf die Unterteilung in diese Zyklen wird in diesem Abschnitt nicht näher eingegangen, sondern an dieser Stelle zunächst nur die Syntheseroute aller dargestellten, dreiarmligen Piperidin-Derivate vorgestellt. Die Reihenfolge der synthetisierten Verbindungen und die Aktivitäten der jeweiligen Inhibitoren werden in Abschnitt 3.3 vorgestellt und diskutiert.

In **Abbildung 65** ist die Retro-Synthese zur Darstellung der Zielverbindungen skizziert. Im letzten Schritt soll der Substituent in 5-Position des Rings eingefügt werden, damit hier eine einfache Derivatisierung durchgeführt werden kann. Das Amin, an dem die Alkylierungsreaktion stattfinden soll, wird durch Umwandlung aus einer Alkoholfunktionalität gewonnen. Die Substituenten am Stickstoff in 3-Position werden ebenfalls durch einfache Alkylierungsreaktionen an ein Amin erhalten. Auch diese Aminfunktionalität wird aus einer Hydroxygruppe dargestellt. Verbindung **103** ist schon aus der Syntheseroute für die Piperidin-Diester bekannt und wird analog zu der dort vorgestellten Route (**Abbildung 58**) aus *trans*-4-Hydroxy-L-Prolin **99** synthetisiert.

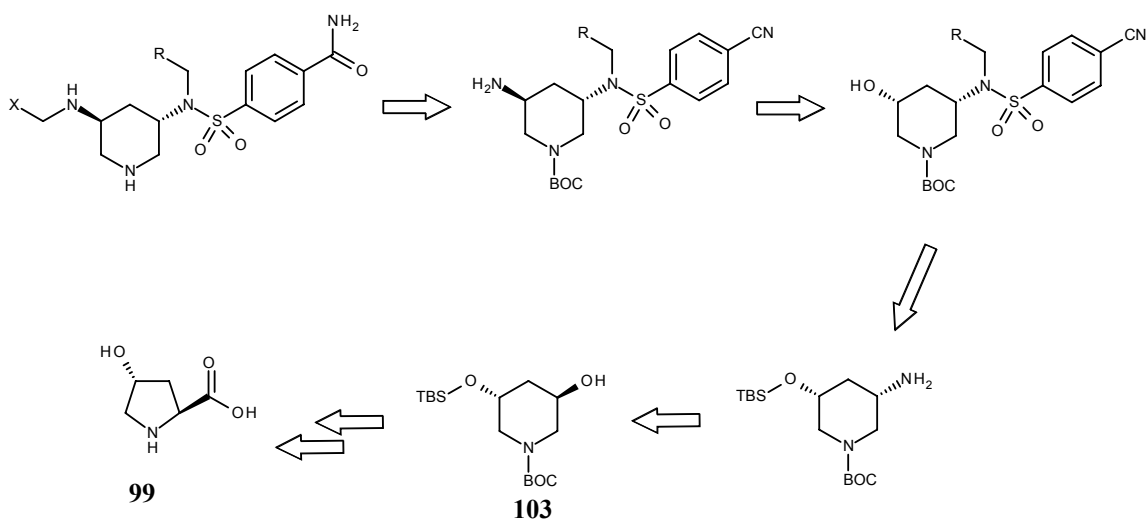


Abbildung 65: Retro-Synthese der dreiarmligen unsymmetrischen Piperidin-Derivate mit *trans*-4-Hydroxy-L-Prolin **99** als Startmaterial.

In **Abbildung 66** ist der erste Abschnitt der Synthese der dreiarmligen Piperidinverbindungen gezeigt. In diesem Teilabschnitt soll der zweiarmlige Substituent in 3-Position des Piperidinrings mit den entsprechenden Resten dekoriert werden. Als Ausgangssubstanz wird Verbindung **103**, die schon für die Synthese der Diester dargestellt wurde, verwendet. In dieser Synthese der unsymmetrisch substituierten

Inhibitoren profitiert man von der stereoselektiven Route zur Darstellung des Piperidin-Grundgerüsts. Aus dieser Synthese (**Abbildung 58**) erhält man das Piperidin-Diol **103**, in dem bereits eine Alkoholfunktionalität geschützt vorliegt. Damit können die drei unterschiedlichen Reste nacheinander und ohne einen zusätzlichen Desymmetrisierungsschritt eingeführt werden. Im ersten Schritt wird die ungeschützte Hydroxygruppe in einem Schritt unter Verwendung der neu entwickelten Methode aus Abschnitt 2.3 zum Amin **116** umgewandelt. Die Transformation vom Alkohol zum Amin konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 77 % durchgeführt werden. Die Aminfunktionalität wird im nächsten Schritt mit 4-Cyano-benzylsulfonylchlorid in guten Ausbeuten zum Sulfonamid **117** umgesetzt.

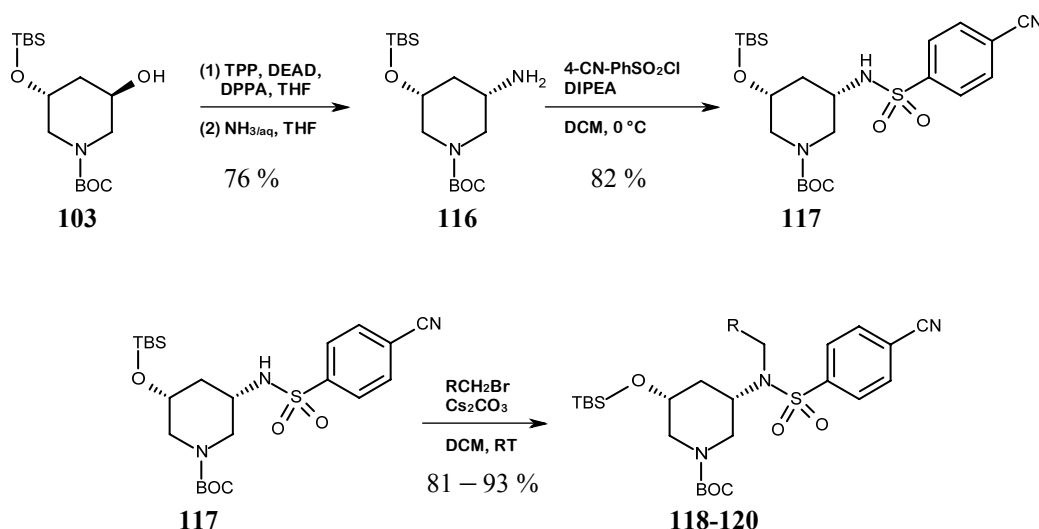
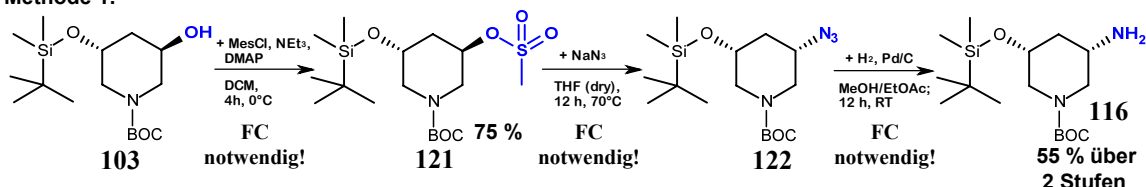


Abbildung 66: Fertigstellung der „rechten“ Seite der dreiarmligen Piperidin-Derivate.

Die in dieser Arbeit neu entwickelte Methode zur Darstellung von Aminen aus Alkoholen führte sowohl zu einer Reduktion der Syntheseschritte und somit zu einer Zeitersparnis als auch zu einer deutlichen Verbesserung der Ausbeute für diesen Schritt im Vergleich zur konventionellen Route. Gerade in einer Synthese über 16 Stufen bedeutet dies einen großen Vorteil. In **Abbildung 67** ist der Vergleich der konventionellen Methode (Methode 1) mit der neuen Methode (Methode 2) dargestellt. Es wird deutlich, dass durch Verwendung der neuen Methode die Anzahl der Reaktionsschritte von drei auf einen reduziert werden konnte. Außerdem beinhaltet die konventionelle Route drei säulenchromatographische Aufarbeitungsschritte, wohingegen mit der neuen Methode nur ein Aufarbeitungsschritt notwendig ist. Auch dadurch kann eine erhebliche Zeitersparnis erreicht werden. Hinzu kommt, dass die Gesamtausbeute vom Alkohol **103** zum Amin **116** über die dreistufige Route mit 41 % deutlich schlechter ist als jene der „Ein-Topf“-Reaktion mit 76 %. Darüber hinaus kann

die Isolation des Azids **122** vermieden und ein zusätzliches Sicherheitsrisiko umgangen werden. Damit macht die neu entwickelte Reaktion die mehrstufige Synthese der dreiarmigen Piperidinverbindungen wesentlich effizienter und erhöht zusätzlich die Gesamtausbeute.

Methode 1:**Methode 2:****Gesamtausbeute:**

Methode 1 41 %

Methode 2 76 %

Abbildung 67: Vergleich der konventionellen (**Methode 1**) mit der neu entwickelten Methode (**Methode 2**) zur Darstellung von Aminen aus Alkoholen. Zwei Vorzüge der Methode 2 sind sofort ersichtlich: Deutliche Verbesserung der Ausbeute auf circa das Doppelte sowie Zeit- und Arbeitersparnis.

Ein weiterer Rest zur Komplettierung der Dekoration des zweiarmigen Substituenten in 3-Position wurde am Sulfonamid-Stickstoff eingefügt. Dazu wurden die entsprechenden Alkylbromide mit dem Sulfonamid und Cäsiumcarbonat als Base zur Reaktion gebracht. Diese Alkylierungsreaktion verläuft in hohen Ausbeuten, und es konnten die in **Tabelle 16** aufgeführten Verbindungen dargestellt werden.

	Ausbeute der Alkylierung	
	R	
<p>118-120</p>	118	93 %
	119	83 %
	120	81 %

Tabelle 16: Dargestellt sind die Reste R der Verbindung **118-120** und die Ausbeuten der entsprechenden Alkylierungsreaktion.

Nach abgeschlossener Dekoration des zweiarmigen Substituenten in 3-Position folgte die Derivatisierung der 5-Position. Bevor der letzte Alkylierungsschritt durchgeführt werden konnte, musste in 5-Position ebenfalls eine Aminfunktionalität eingeführt werden. Die Reaktionssequenz bis zum Amin **125a-c** ist in **Abbildung 68** dargestellt. Zu Beginn musste die TBS-Schutzgruppe des Alkohols unter Bedingungen abgespalten werden, bei denen die Boc-Schutzgruppe am Piperidin-Stickstoff erhalten bleibt. Durch Verwendung von *tetra-n*-Butylammoniumfluorid (TBAF) wurde der Alkohol **123** in guten Ausbeuten erhalten. Anschließend wurde die Hydroxygruppe durch ein Azid unter Inversion des Stereozentrums ausgetauscht, welches jedoch diesmal nicht im direkten Anschluss zum Amin reduziert wurde. Für diese Reaktion kann ebenfalls DPPA als Azid-Quelle verwendet werden. Durch Verwendung von DPPA unter Mitsunobu-Bedingungen wird auch die gewünschte Umkehr des Stereozentrums erreicht. [116]

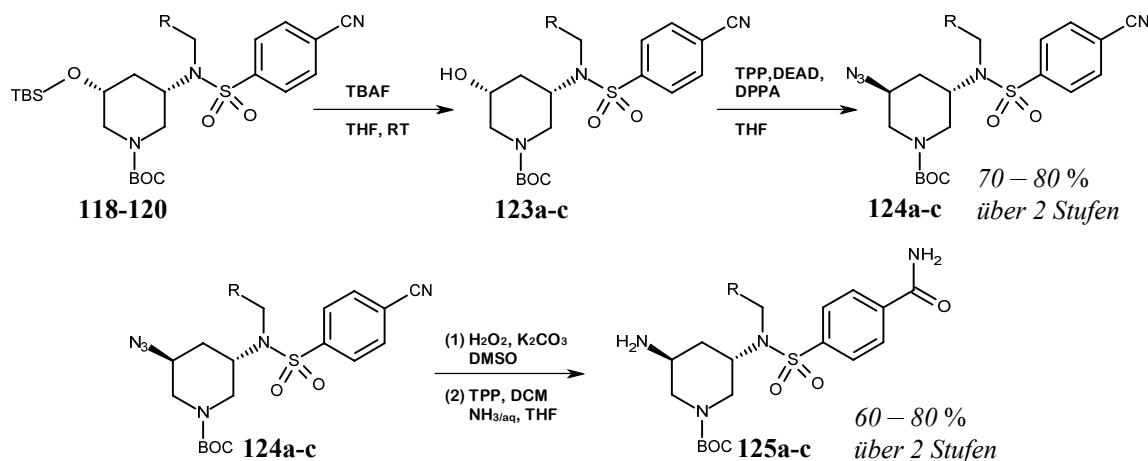


Abbildung 68: Synthese des Amins **125a-c**, die Ausgangsverbindung für die sich abschließende Alkylierung mit Bromiden oder Umsetzung mit Aldehyden. (a: -Benzyl; b: -Naphthyl; c: -CF₃-Benzyl)

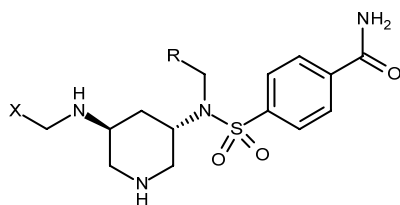
In den nachfolgenden beiden Schritten wurde zunächst das aromatische Nitril zum Carboxamid hydrolysiert und anschließend das Azid in 5-Position des Piperidinrings in einer Staudinger-Reaktion zum entsprechenden Amin reduziert. Auf diese Weise konnte Verbindung **125** erhalten werden, die als Ausgangspunkt für die abschließende Derivatisierung eingesetzt wurde. Die finalen Schritte bis zum fertigen Inhibitor sind in **Abbildung 69** gezeigt.



Abbildung 69: Alkylierung des primären Amins mit Bromiden oder Aldehyden mit abschließender Boc-Entschützung.

Zur Dekoration des Amins in 5-Position des Piperidins wurde der jeweilige Substituent entweder mittels einer reduktiven Aminierung mit Aldehyden oder einer einfachen Alkylierungsreaktion mit Alkylbromiden eingefügt (Verbindungen **126a-136a**). Durch die Abspaltung der Boc-Gruppe im letzten Schritt wurde der gewünschte Inhibitor erhalten. In **Tabelle 17** sind alle dreiarmligen Piperidin-Inhibitoren **126b-136b**, die synthetisiert werden konnten einschließlich der Ausbeuten der finalen Stufen aufgeführt.

Alle synthetisierten Verbindungen wurden gegen HIV-Protease und Endothiapepsin im Enzym-Aktivitätsassay vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen werden in Abschnitt 3.3 vorgestellt und diskutiert.



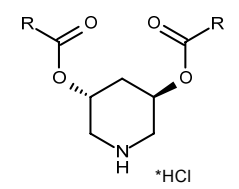
	R	X	Ausbeute Alkylierung	Ausbeute Entschützung
126b **			65 % [a]	20 %
127b			65 % [a]	75 %
128b			63 % [b]	84 %
129b			70 % [b]	77 %
130b			88 % [b]	64 %
131b			77 % [b]	79 %
132b			98 % [a]	60 %
133b			90 % [a]	70 %
134b			65 % [b]	75 %
135b			70 % [b]	68 %
136b			90 % [a]	42 % *

Tabelle 17: Synthetisierte Verbindungen der unsymmetrischen, dreiarmligen Piperidin-Derivate **126-136** mit den Ausbeuten der letzten zwei Stufen; [a] Bromid bzw. [b] Aldehyd zur Alkylierung eingesetzt; * Ausbeute über zwei Schritte inklusive Reduktion der Nitrogruppe; ** Verbindung konnte nicht in angemessener Reinheit erhalten werden.

3.3 Struktur-Aktivitäts-Bestimmung

3.3.1 Piperidin-Diester

Die Ergebnisse der Affinitätsbestimmung der Piperidin-Diester sowohl gegen die HIV-Protease als auch gegen Endothiapepsin sind in **Tabelle 18** aufgeführt. Die Inhibitionswerte gegen die HIV-Protease sind insgesamt nicht zufriedenstellend, da keine der Verbindungen Affinitäten bis in den einstellig mikromolaren Bereich erreichen konnte. Die beste Inhibition zeigten der 1-Naphthylelessigsäure- **107b**, der Fluoren-9-carbonsäure- **112b** sowie der Indol-3-propansäurediester **111b** mit K_i -Werten von 15 bis 30 μM . Der 2-Naphthylelessigsäurediester **106b** verliert Affinität um den Faktor 4 im Vergleich zum 1-Naphthyl-Derivat **107b**. Dieser Affinitätsverlust scheint durch eine schlechtere Ausrichtung des Naphthylrests bedingt zu sein. Auch die Einführung eines Chloratoms am Aromaten in *m*-Position (**105b**) verschlechtert die Affinität im Vergleich zum unsubstituierten Derivat **104b** erheblich. Beide 4-Biphenylderivate **108b** und **109b** zeigen keinerlei Inhibition gegen die HIV-Protease. Der 4-Biphenyl-Substituent scheint, zumindest in dieser Ausrichtung, zu viel Platz einzunehmen und mit der Oberfläche des Enzyms zusammenzustößen. Der Indol-3-essigsäurediester **110b** zeigt im Vergleich mit dem Molekül **111b**, welches in der Seitenkette eine CH_2 -Gruppe mehr aufweist, eine um den Faktor 10 verringerte Affinität. Wahrscheinlich ist durch den flexibleren Substituenten die Ausrichtung und damit die Besetzung der Tasche besser möglich. Interessante Ergebnisse liefert die Gegenüberstellung der Verbindungen **112b-114b**, die strukturell einander sehr ähnlich sind. Das Diphenylelessigsäure-Derivat **113b** besitzt einen K_i -Wert von über 200 μM während der Fluoren-9-carbonsäurediester **112b** einen K_i -Wert von 28 μM erreicht. Im Diphenylelessigsäure-Derivat sind die Phenylringe aus sterischen Gründen gegeneinander verdreht, wohingegen der Substituent im Fluoren-Derivat weitgehend planare Geometrie besitzt. **112b** muss durch die Methylenbrücke eine Geometrie einnehmen können, die besser zu der Taschengometrie der HIV-Protease passt. Darüber hinaus weist der 3,3-Diphenylpropansäurediester **114b**, der durch die zusätzliche CH_2 -Gruppe in der Seitenkette tiefer in die Tasche hineinragen kann, mit 45 μM ebenfalls eine um den Faktor 4 erhöhte Affinität gegenüber dem Diphenylelessigsäure-Derivat **113b** auf.



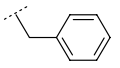
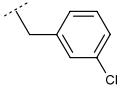
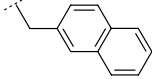
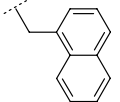
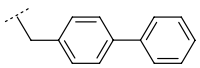
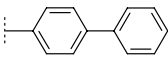
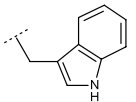
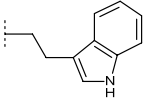
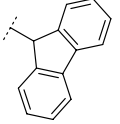
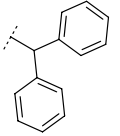
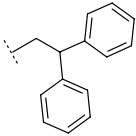
	R	HIV-PR K _i /[μM]	EP K _i /[μM]
104b	 [1]	84,0	27,2
105b		> 300	10
106b		59,6	1,5
107b		15,5	8,6
108b		k. I.	0,75
109b		k. I.	25
110b		> 300	1,7
111b		34,0	0,80
112b		28,3	1,8
113b		> 200	1,5
114b		45,3	1,9

Tabelle 18: Affinitätswerte der synthetisierten Verbindungen der Piperidin-Diester gegenüber der HIV-Protease (HIV-PR) und Endothiapepsin (EP). „k. I.“ steht für keine Inhibition; [1] Verbindung wurde nur über ¹H-NMR und Massenspektrometrie analysiert.

In **Abbildung 70** sind die Dockinglösungen dieser drei Verbindungen im Vergleich dargestellt, wodurch die experimentell beobachteten Ergebnisse veranschaulicht werden können. Die integrierte Bewertungsfunktion des Dockingprogramms FlexX bewertet das Fluoren-Derivat **112b** leicht besser als das 3,3-Diphenylpropansäurediester **114b** und mit großem Abstand vor dem Diphenylelessigsäure-Derivat **113b** (FlexX-Score für **112b-114b**: -16,9, -9,9 und -15,6). Dieses Ergebnis stimmt vollkommen mit den experimentell bestimmten Daten überein. Als Begründung für die allgemein moderaten Inhibitionswerte könnte die suboptimale Ausrichtung der Substituenten für die Taschenbesetzung der HIV-Protease angeführt werden. Zum anderen besitzen die Diester **104b-111b** nur zwei Substituenten, die somit auch nur zwei der Spezifitätstaschen mittels der entsprechenden hydrophoben Wechselwirkungen adressieren können. Ausnahmen stellen die Verbindungen **112b-114b** dar, die bei optimaler Geometrie auch in der Lage sein könnten, alle vier Spezifitätstaschen zu besetzen.

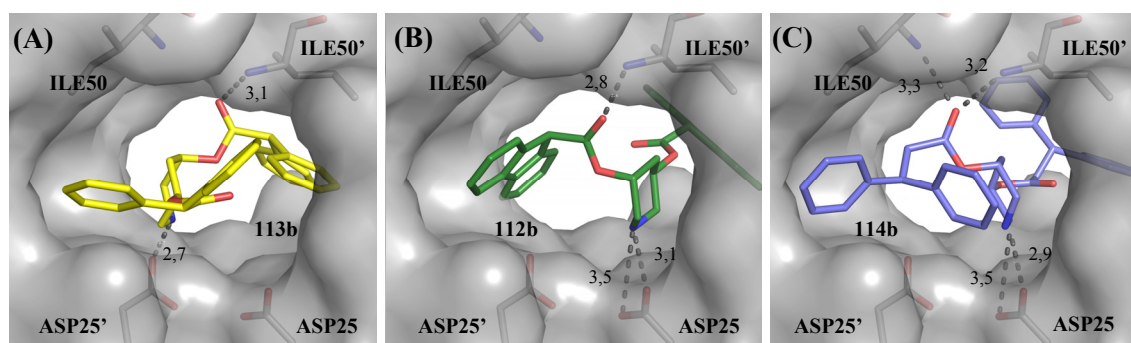


Abbildung 70: Dargestellt sind die durch FlexX vorhergesagten Dockingmoden nach Minimierung mit MiniMuDS für die Piperidin-Diester **112b-114b**. (A) Das Diphenylelessigsäure-Derivat **113b** (in gelb) wird von FlexX im Vergleich zu den beiden anderen Verbindungen am schlechtesten bewertet (FlexX-Score: -9,9); das Piperidin-Grundgerüst muss sich in diesem Fall stark verdrehen, um die Spezifitätstaschen mit den Diphenylsubstituenten noch besetzen zu können; dadurch kann das zentrale Stickstoffatom nur eine Wasserstoffbrücke zum katalytischen Zentrum aufbauen. (B) veranschaulicht den Bindungsmodus der Verbindung **112b**. Der zentrale Piperidinring ist so positioniert, dass das Stickstoffatom zwei Wasserstoffbrücken zu Aspartat 25 aufbauen kann, sowie das Carbonylsauerstoffatom des axialen Substituenten mit Isoleucin 50' interagiert. In (C) kann der Heterozyklus so angeordnet werden, dass sowohl Isoleucin 50 als auch 50' durch das Carbonylkohlenstoffatom adressiert werden kann. Für beide Verbindungen **112b** und **114b** werden Affinitäten in vergleichbaren Bereichen vorhergesagt (FlexX-Score: -16,9 und -15,5).

Die Inhibitionswerte der Piperidin-Diester wurden ebenfalls gegen Endothiapepsin getestet und zeigten über alle Verbindungen dieser Serie hinweg zum Teil erheblich bessere Affinitäten als gegen die HIV-Protease. Mit Inhibitor **108b** und **111b** konnten zwei Verbindungen entwickelt werden, die Aktivitäten bis in den nanomolaren Bereich aufweisen. Anders als bei der HIV-Protease zeigen die beiden Naphthylderivate **106b** und **107b** eine umgekehrte Struktur-Wirkungsbeziehung. Der 2-Naphthylelessigsäurediester **106b** besitzt einen um den Faktor 6 verbesserten K_i -Wert als das 1-Naphthyl-Derivat **107b**. Der 4-Biphenylelessigsäurediester **108b** ist mit 750 nM der aktivste Inhibitor dieser Serie gegen Endothiapepsin, während gegen die HIV-Protease keine Inhibition feststellbar war. Die Spezifitätstasche des Endothiapepsins kann folglich durch den sehr großen 4-Biphenylsubstituenten besetzt werden, ohne mit der Oberfläche des Enzyms zusammenzustößen. In **Abbildung 71** ist der generierte Bindungsmodus für das erwähnte Biphenyl-Derivat **108b** im Komplex mit Endothiapepsin dargestellt. Im Gegensatz dazu konnte im Dockingexperiment mit der HIV-Protease kein sinnvoller Bindungsmodus für diese Verbindung modelliert werden. Damit scheint Endothiapepsin größere hydrophobe Substituenten besser zu tolerieren als die HIV-Protease.

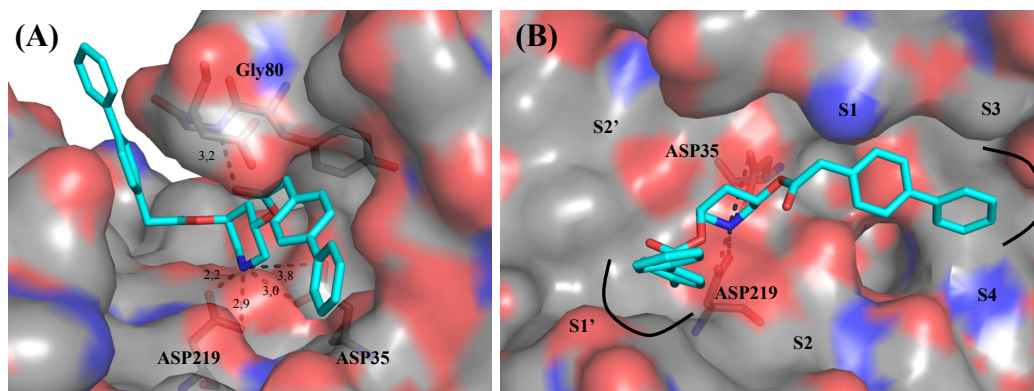


Abbildung 71: Dargestellt ist der durch FlexX vorgeschlagene Bindungsmodus für den 4-Biphenylelessigsäurediester **108b** in Komplex mit Endothiapepsin (pdb-Code: 1E80). (A) Seitenansicht in die Bindetasche; (B) Blickwinkel von oben auf das Enzym, wobei die Flapregion entfernt worden ist. Das zentrale Stickstoffatom adressiert die Aspartate 35 und 219 und ein Carbonylsauerstoff interagiert über das Rückgrat-NH des Gly80 mit der Flapregion. Der äquatoriale Rest adressiert sehr gut die S1- bzw S3-Tasche, während der axiale Substituent fast aus der Bindetasche nach oben hinausragt, aber dennoch viele hydrophobe Wechselwirkungen in der S1'-Tasche aufbaut.

Entgegen der Erkenntnisse, die für die verzweigten Diphenylverbindungen **113b** und **114b** sowie das Fluoren-Derivat **112b** gegen die HIV-Protease erhalten werden konnten, ist eine Differenzierung dieser Verbindungen gegen Endothiapepsin nicht erkennbar. Alle drei K_i -Werte liegen im gleichen Affinitätsbereich (1,5 bis 1,9 μM). In **Abbildung 72** sind die Dockinglösungen der vierarmigen Verbindungen im Komplex mit Endothiapepsin dargestellt. Sowohl die Bewertungsfunktion von FlexX als auch DrugScore klassifizieren die generierten Bindungsgeometrien sehr ähnlich (FlexX-Score: -20,2 bis 27,1; DrugScore: -147.173 bis -170.637), was sich auch im analogen Bindungsmodus widerspiegelt. Die deutlich besseren Affinitäten dieser Inhibitoren gegen Endothiapepsin im Vergleich zur HIV-Protease bestätigen die Ergebnisse der gezeigten Dockingexperimente (**Abbildung 70** und **Abbildung 72**). Das zentrale Piperidin-Grundgerüst wird mittig zwischen den beiden katalytischen Aspartaten 35 und 219 positioniert, wodurch ein vorteilhaftes Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen diesen und dem sekundären Amin aufgebaut werden kann. Das Carbonylsauerstoffatom des axialen Substituenten adressiert die Flapregion über das Rückgrat-NH des Gly80, während das Carbonylsauerstoff des äquatorialen Rests mit dem Rückgrat-NH des Asp81 interagiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Piperidin-Diester gegen Endothiapepsin vielversprechende Ergebnisse lieferten, vor allem vor dem Hintergrund, dass es sich bei dieser Inhibitorklasse nur um zweiarmige Liganden handelt. Von elf synthetisierten Verbindungen liegt die Aktivität von acht Molekülen unter einem K_i von 2 μM , wovon zwei sogar nanomolare Affinitäten aufweisen.

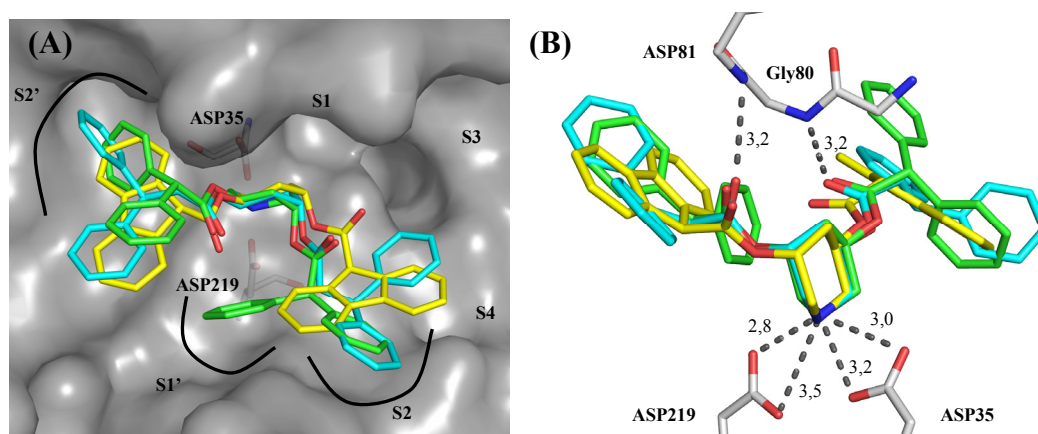


Abbildung 72: Dargestellt sind die mittels FlexX modellierten Bindungsgeometrien der Verbindungen **112b-114b** im Komplex mit Endothiapepsin (**112b** in gelb, **113b** in grün und **114b** in türkis; Bindungslängen in Å). (A) Überlagerung der drei Inhibitoren bezüglich ihrer Taschenbesetzung; die Flapregion wurde zur besseren Übersicht entfernt. (B) Bindungsmodus der Inhibitoren.

Die deutliche Affinitätssteigerung der gesamten Verbindungsklasse gegenüber Endothiapepsin im Vergleich zur HIV-Protease soll noch an einem weiteren Beispiel veranschaulicht werden. Der Indolessigsäurediester **110b** zeigt gegenüber der HIV-Protease einen K_i -Wert von über 300 μM , während gegen Endothiapepsin ein Wert von 1,7 μM bestimmt werden konnte. In **Abbildung 73** sind die vorhergesagten Bindungsmodi für Verbindung **110b** sowohl im Komplex mit Endothiapepsin als auch mit der HIV-Protease einander gegenüber gestellt. Verbindung **110b** ist durch die vorgegebene Ausrichtung der Substituenten in der Lage, die Spezifitätstaschen S1 und S2' im Enzym Endothiapepsin angemessen zu besetzen. Darüber hinaus sind die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks mit beiden katalytischen Aspartaten (35 und 219) sowie die Interaktion zur Flapregion über die Esterfunktionalität möglich. Im Vergleich dazu scheint der Inhibitor im Komplex mit der HIV-Protease zwar auch die Interaktionen mit den katalytischen Aspartaten und einem Isoleucin der Flapregion eingehen zu können, allerdings sind die Spezifitätstaschen nicht optimal adressiert. Der erhebliche Unterschied in der Bindungsaffinität ist möglicherweise auf eine bessere Taschenbesetzung zurückzuführen.

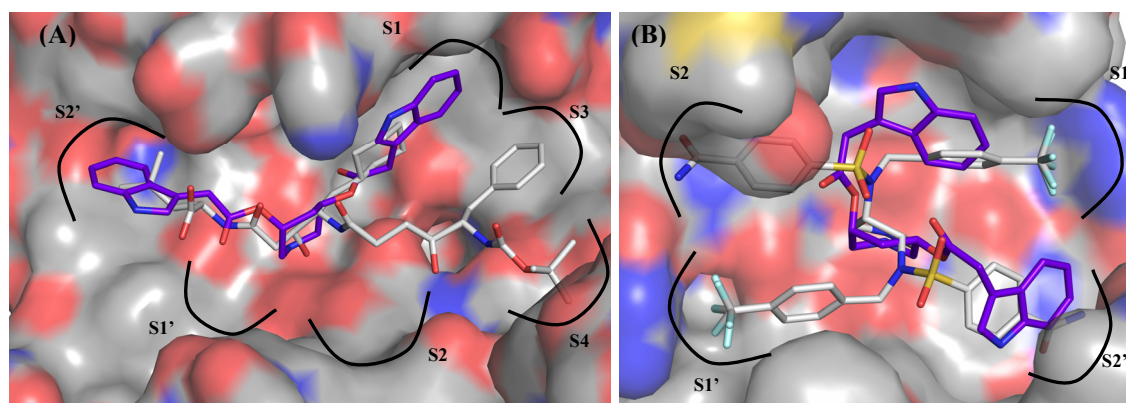
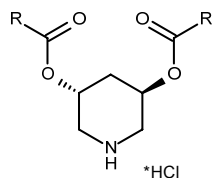


Abbildung 73: Mittels FlexX generierter Bindungsmodus der Verbindung **110b** in violett nach abschließender Minimierung durch MiniMuDS im Komplex mit Endothiapepsin (**A**) und der HIV-Protease (**B**); in grau ist ein potenter Inhibitor dargestellt (pdb-Code: 1EED bzw. 2QNN); die Flap wurde zur besseren Übersicht entfernt.

Zur besseren Bewertung der Inhibitionswerte wurden auch für die Diester die Liganden-Effizienzen (LE) sowie die „fit quality“ (FQ) bestimmt und in **Tabelle 19** zusammengestellt. [147] Betrachtet man die Liganden-Effizienzen der Diester im Vergleich zum einfachsten Vertreter dieser Inhibitor-Serie, dem Benzyl-Derivat **104b**, so konnte diese für drei Verbindungen (**109b-111b**) verbessert werden. Eine

Verbesserung der LE deutet an, dass durch Einführen der Substituenten eine Affinitätssteigerung pro „heavy-atom“ (HA) erreicht werden konnte. Eine Verschlechterung der LE bedeutet, dass mit der Vergrößerung der Substituenten keine entsprechende Affinitätssteigerung einhergeht.



	R	EP K _i [μM]	LE [kcal·mol ⁻¹]	FQ
104b		27,2	0,24	0,63
105b		10	0,24	0,68
106b		1,5	0,23	0,77
107b		8,6	0,20	0,67
108b		0,75	0,22	0,78
109b	[a]	25	0,29	0,66
110b		1,7	0,25	0,77
111b		0,80	0,25	0,80
112b		1,8	0,21	0,74
113b		1,5	0,21	0,75
114b		1,9	0,20	0,72

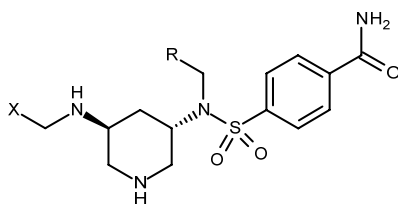
Tabelle 19: Liganden-Effizienzen (LE) und „fit qualities“ (FQ) der Piperidin-Diester für Endothiapepsin (EP); [a] kein Diester, da in der Synthese nur eine einfache Esterkupplung stattgefunden hat.

Beispielsweise besitzen sowohl der 4-Biphenylessigsäurediester **108b** als auch der Indol-3-propansäurediester **111b** K_i -Werte von 750 nM, allerdings ergeben sich LEs von jeweils 0,22 und 0,25 kcal·mol⁻¹. Dieser Unterschied ist auf den etwas kleineren Indol-3-propanrest (11 HA gegenüber 13 HA des 4-Biphenylrests) zurückzuführen, der aber eine identische Aktivität zum Enzym aufbauen kann. Daraus ergibt sich für diese Verbindung **111b** eine bessere LE und das auch im Vergleich zur Referenzverbindung **104b**. Die beste LE mit 0,29 kcal·mol⁻¹ kann für die einfach veresterte Verbindung **109b** berechnet werden. Dieses Ergebnis lässt erahnen, dass eventuell eine unsymmetrische Substitution von Vorteil sein könnte. Beispielsweise könnte versucht werden, die freie Alkoholfunktionalität mit Indol-3-propansäure oder 4-Biphenylessigsäure zu substituieren und dadurch eine Erhöhung der Affinität zu erreichen.

Der Vergleich der FQs verdeutlicht, dass jede Variation der Substituenten im Vergleich zum Benzyl-Derivat **104b** zu einer Verbesserung in der Passgenauigkeit in der Bindetasche geführt hat. Die FQs konnten von einem moderaten Wert mit 0,63 für das Benzyl-Derivat **104b** auf sehr gute 0,80 für den Indol-3-propansäurediester **111b** erhöht werden, was für einen zweiarmigen Liganden ein beachtenswertes Ergebnis ist. Damit stellt dieser Inhibitor einen vielversprechenden Ausgangspunkt zur weiteren Optimierung nach erfolgreicher Röntgenkristallographie im Komplex mit Endothiapepsin dar.

3.3.2 Dreiarmlige Piperidin-Derivate

Im ersten Syntheszyklus wurden für R die Benzylgruppe sowie für X drei unterschiedliche Substituenten, der Benzyl-, der 4-Trifluorbenzyl- sowie der 3-Hydroxybenzyl-Rest ausgewählt (siehe **Tabelle 20**). Während das 4-Trifluorbenzyl-Derivat **127b** keine Affinitäten gegen die HIV-Protease zeigte, konnte bei Verbindung **128b** eine schwache Inhibition mit einem K_i von 177 μ M beobachtet werden. Darauf aufbauend wurde der 3-Hydroxyrest für die Position X beibehalten und an Position R versucht, die hydrophobe Kontaktfläche in der Spezifitätstasche der HIV-Protease zu vergrößern, um dadurch die Affinität zu erhöhen. Für diese Anforderung wurde die 2-Naphthyl- sowie die 4-Trifluorbenzylgruppe ausgewählt, da diese Substituenten bekanntermaßen in der Lage sind, gute Aktivitäten durch Besetzung der S1-Tasche hervorzurufen.



	Nr.	R	X	HIV-Protease K_i /[μ M]	Endothiapepsin K_i /[μ M]
1. Design- zyklus	127b			k. I.	k. I.
	128b			177,3	1,8
2. Design- zyklus	129b			94,2	8,2
	130b			58,7	1,3
3. Designzyklus	131b			40,7	1,6
	132b			39,4	0,6
	133b			k. I.	2,2
	134b			87,1	4,1
	135b			14,2	1,0
	136b			65,7	1,5

Tabelle 20: Affinitätswerte der synthetisierten Verbindungen der dreiarmligen Piperidinklasse gegenüber der HIV-Protease und Endothiapepsin. „k. I.“ steht für keine Inhibition, bzw. kein K_i -Wert bestimmbar.

Tatsächlich konnte in beiden Fällen die Affinität der Verbindungen **129b** und **130b** im Vergleich zum Benzyl-Derivat **128b** verbessert werden. Für das 4-Trifluorbenzylderivat **129b** konnte eine Aktivitätssteigerung um das Doppelte auf 94 μ M und für das 2-Naphthylderivat **130b** sogar um das Dreifache auf 58 μ M erreicht werden. Folglich wurde im dritten Designzyklus der 2-Naphthylsubstituent für die

Position R ausgewählt und mit fünf weiteren Resten für die Position X zusammengesetzt. Wie zu erwarten, zeigte die 3-Nitroverbindung **133b**, die synthetische Vorstufe von **136b**, keine Affinität gegen die HIV-Protease. Mit Ausnahme des Indazolderivats **135b** konnten für die anderen drei Verbindungen (**132b**, **134b** und **136b**) keine nennenswerten Verbesserungen gegenüber der zu optimierenden Struktur aus dem zweiten Syntheszyklus erreicht werden. Für die Indazolverbindung **135b** konnte die Affinität um den Faktor 4 auf 14 μM gesteigert werden. Durch die systematische Variation der Substituenten wurde das Inhibitionsvermögen der Piperidin-basierten Inhibitor-Klasse bis in den niedrig mikromolaren Bereich erhöht.

Das Lösen einer Kristallstruktur könnte wichtige Informationen über den vorliegenden Bindungsmodus dieser Klasse liefern, und darauf aufbauend wären gezielte Veränderungen am Molekül möglich, die eine weitere Verbesserung der Affinität hervorbringen könnten. Es konnten, trotz intensiver Bemühungen von Ina Lindemann aus dem Arbeitskreis von Professor Dr. Klebe, mit keiner dieser Verbindungen eine Kristallstruktur im Komplex mit der HIV-Protease erhalten werden. Vor der Lösung einer Kristallstruktur weitere Verbindungen zu synthetisieren erschien nicht sinnvoll, da die Synthese dieser Inhibitor-Klasse mit 16 Stufen zu aufwendig und in angemessener Zeit keine ausreichende Anzahl an Verbindungen zu erhalten gewesen wäre, um eine aussagekräftige Struktur-Wirkungs-Beziehung ableiten zu können. Das gesetzte Ziel, durch Einführen eines dritten Substituenten im Vergleich zu den Piperidin-Diestern die Affinität weiter zu steigern, konnte nicht erreicht werden. Das Indazolderivat **135b**, der affinste Inhibitor dieser Serie, besitzt mit 14 μM nur einen leicht verbesserten K_i -Wert als die besten Piperidin-Diester (**107b**, **111b** und **112b**) mit K_i -Werten im Bereich zwischen 20 und 30 μM .

Wie auch schon bei der Verbindungsklasse der Piperidin-Diester festzustellen war, zeigten die dreiarmigen Piperidin-basierten Inhibitoren gegen Endothiapepsin generell deutlich bessere Affinitäten, die sich alle im einstellig mikromolaren Bereich befinden. Im Vergleich zur HIV-Protease sind die Affinitäten gegen Endothiapepsin um den Faktor 11 bis 99 besser.

Werden die drei 3-Hydroxybenzylverbindungen **128b-130b** einander gegenübergestellt, fällt auf, dass der einfache Benzylrest für die Position X gut geeignet zu sein scheint. Die Umwandlung in die größeren und hydrophoberen Substituenten, den 4-Trifluorbenzyl- und den 2-Naphthylrest, führen zu keiner deutlichen Verbesserung der Affinität. Im Fall des 4-Trifluorbenzylrestes ist sogar eine Verschlechterung um den

Faktor 4 im Vergleich zum Benzylrest festzustellen. Die Naphthylverbindung **130b** zeigt mit einem K_i von 1,3 μM nur eine ähnliche Aktivität wie das Benzylderivat **128b** ($K_i = 1,8 \mu\text{M}$), was sich auch in einer sehr ähnlichen LE von 0,21 bzw. 0,22 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ widerspiegelt.

Die beiden potentesten Verbindungen gegen Endothiapepsin sind auch die beiden Besten aus der Serie gegen die HIV-Protease, allerdings in umgekehrter Reihenfolge (siehe **Tabelle 20**). Das Indazolderivat **135b** und die Methylesterverbindung **132b** weisen K_i -Werte von 1 bzw. 0,6 μM auf. Damit konnte zwar das Inhibitionsvermögen dieser Verbindungsklasse innerhalb der Serie bis in den nanomolaren Bereich verbessert werden, aber im Vergleich zu den zweiarmigen Diestern konnte die durch die Einführung eines dritten Substituenten erhoffte Affinitätssteigerung nicht erreicht werden. Auch hier wäre eine Kristallstruktur sehr hilfreich, um weitere Optimierungsschritte anzuschließen. Diese konnte trotz mehrerer Kristallisationsversuche durch Barbara Wienen und Stefanie Dörr leider bisher nicht erhalten werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Piperidin-Grundgerüst prinzipiell in der Lage ist, Aspartat-Proteasen zu adressieren und zu inhibieren. Ob aber die vorliegende Konfiguration der Stereozentren, die anhand eines Dockingexperimentes ausgewählt worden war, tatsächlich die optimale Ausrichtung der Substituenten darstellt, ist aus diesen Ergebnissen nicht eindeutig abzuleiten. Gegebenfalls könnten die Affinitäten weiter gesteigert werden, wenn die Substituenten auf die Taschenbesetzung und die Konfigurationen der Stereozentren weiter untersucht und optimiert würden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, neuartige Substanzklassen für die Inhibition der Aspartat-Proteasefamilien A1 und A2 zu identifizieren. Als Modellenzyme wurden Endothiapepsin als ein Vertreter der Familie A1 und die HIV-Protease als Vertreter der Familie A2 ausgewählt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden mit den zyklischen Harnstoffen, den Piperidin-Diestern, den dreiarmigen Piperidinen, den offenkettigen primären Aminen und den Hydroxylaminen fünf unterschiedliche Inhibitor Klassen Computer-basiert entwickelt, synthetisiert und bezüglich ihrer Affinität gegen Endothiapepsin und die HIV-Protease analysiert. Dabei ist es gelungen, für jede Substanzklasse, mit Ausnahme der zyklischen Harnstoffe, mindestens einen Inhibitor bis in den submikromolaren Affinitätsbereich hinein zu optimieren. In **Tabelle 21** sind die affinsten Inhibitoren der jeweiligen Substanzklasse gegen Endothiapepsin und gegen die HIV-Protease zusammengestellt. Die Inhibitor Klasse der zyklischen Harnstoffe konnte gegen Endothiapepsin bis in den niedrigen mikromolaren Bereich verbessert werden, was in Anbetracht der geringen Größe der Verbindung und der Dekoration mit nur zwei Substituenten ein sehr gutes Ergebnis darstellt. Verbindung **61d** stellt mit einem K_i von 2 μM und einer LE von $0,26 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ einen idealen Ausgangspunkt für weitere Optimierungsschritte nach Auflösen des Bindungsmodus im Komplex mit Endothiapepsin durch Röntgenkristallographie dar. Mit den Piperidin-Diestern konnte ebenfalls ein vielversprechendes Grundgerüst zur Hemmung Aspartat-Proteasen der Familie A1 entwickelt werden. Die Verbindungen **108b** und **111b** zeigen Affinitäten gegen Endothiapepsin von 750 nM, obwohl auch hier nur zwei Substituenten für die Besetzung der Spezifitätstaschen zur Verfügung stehen. Die Affinitäten dieser Verbindungsklasse können sicherlich durch gezielte Optimierung weiter erhöht werden, wofür eine Kristallstruktur ebenfalls eine große Hilfe wäre. Hervorzuheben ist außerdem, dass die Verbindung **108b** keine Affinität gegenüber der HIV-Protease besitzt, sondern selektiv Endothiapepsin als Modellenzym der Familie A1 hemmt. In der Substanzklasse der dreiarmigen Piperidine konnte keine deutliche Verbesserung durch das Einführen eines dritten Substituenten im Vergleich zu den Piperidin-Diestern erreicht werden. Dennoch konnte auch hier mit Verbindung **132b** ein Inhibitor mit submikromolarer Affinität gegen Endothiapepsin gefunden werden. In der Serie von elf synthetisierten Inhibitoren lagen dabei neun mindestens im einstellig mikromolaren Aktivitätsbereich.

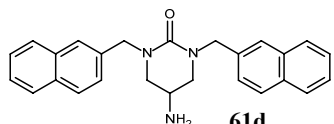
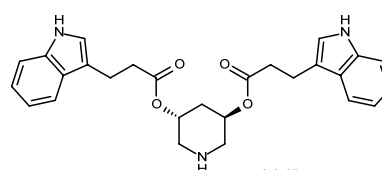
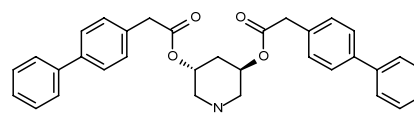
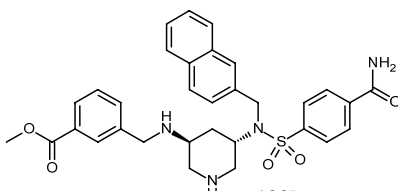
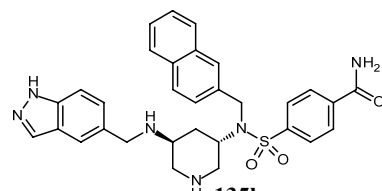
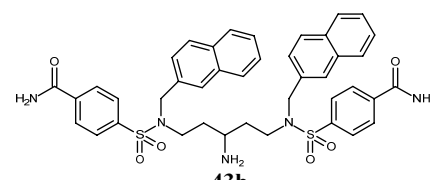
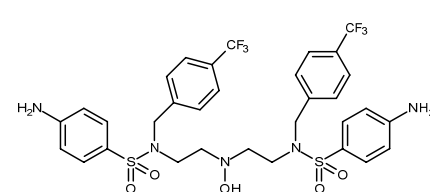
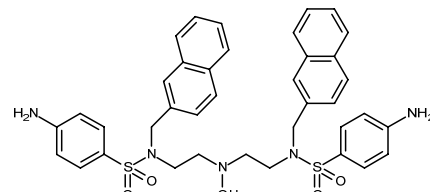
zyklische Harnstoffe Serie von 6 Inhibitoren	 <p>61d <i>EP: 2 μM HIV-PR: 100 μM</i></p>	
Piperidin-Diester Serie von 11 Inhibitoren	 <p>111b <i>EP: 750 nM HIV-PR: 34 μM</i></p>	 <p>108b <i>EP: 800 nM HIV-PR: k.I.</i></p>
dreiarmlige Piperidin-Derivate Serie von 10 Inhibitoren	 <p>132b <i>EP: 600 nM HIV-PR: 39 μM</i></p>	 <p>135b <i>EP: 1 μM HIV-PR: 14 μM</i></p>
offenkettige primäre Amine Serie von 10 Inhibitoren	 <p>43b <i>EP: 550 nM HIV-PR: 22 μM</i></p>	
Hydroxylamine Serie von 7 Inhibitoren	 <p>30d <i>EP: 500 nM HIV-PR: 140 nM</i></p>	 <p>30c <i>EP: 1,2 μM HIV-PR: 820 nM</i></p>

Tabelle 21: Zusammenfassung der aktivsten Inhibitoren inkl. der entsprechenden K_i -Werte der jeweiligen Substanzklasse; EP: Endothiapepsin; HIV-PR: HIV-Protease; k.I.: keine Inhibition.

Auch für die HIV-Protease konnte in dieser Serie die Affinität mit 14 μ M für das Indazol-Derivat **135b** in einen Bereich hinein verbessert werden, in dem grundsätzlich die Chance zur Kristallisierbarkeit gegeben ist. Trotz diverser Kristallisationsversuche konnte auch hier bis *dato* keine Kristallstruktur erhalten werden. Für eine erfolgreiche Kristallisation spielt allerdings nicht nur die Affinität des Inhibitors, sondern auch die Löslichkeit des Moleküls im wässrigen Medium eine entscheidende Rolle. Dabei gilt die Regel, dass eine Löslichkeit des Inhibitors vorliegen sollte, die um ca. den Faktor 100 über dessen K_i liegt. Demnach könnte eine schlechte Löslichkeit der Verbindungen eine einfache Kristallisation verhindern. Dennoch scheint die Piperidin-Grundstruktur

für die Adressierung der HIV-Protease ebenfalls geeignet zu sein, allerdings müsste wahrscheinlich die Ausrichtung der Substituenten besser an die Gegebenheiten des Enzyms angepasst werden, um eine weitere Verbesserung der Affinität erreichen zu können.

Mit Verbindung **43b** konnte ein Vertreter der Substanzklasse der offenkettigen primären Amine entwickelt werden, der mit 500 nM gegenüber Endothiapepsin einen potenten Inhibitor darstellt. Auch die anderen Inhibitoren dieser Serie zeigen moderate bis gute Affinitäten gegen dieses Enzym, wohingegen die Affinitäten gegen die HIV-Protease deutlich schlechter sind und im zweistellig mikromolaren Bereich liegen.

In den bisher vorgestellten vier Verbindungsklassen waren die Inhibitionswerte gegen Endothiapepsin denen der HIV-Protease deutlich überlegen. Umgekehrt ist dies bei der Inhibitorklasse der Hydroxylamine. Ausgangspunkt dieser Serie war Verbindung **28a** mit einem K_i von 96 μM . Durch Variation des Substitutionsmusters konnten innerhalb dieser Substanzklasse zwei von sieben dargestellten Verbindungen gegen die HIV-Protease nanomolare Aktivitäten erreichen. Mit Verbindung **30d** konnte sogar ein K_i von 140 nM erhalten werden, was für eine initiale Serie ohne Kenntnisse über den Bindungsmodus ein ausgesprochen gutes Ergebnis darstellt. Bei den Hydroxylamin-Derivaten konnte innerhalb der Serie eine klare Struktur-Wirkungsbeziehung aufgestellt werden, durch die fundierte Annahmen über den Bindungsmodus möglich sind. Das Lösen einer Kristallstruktur könnte auch hier die entscheidenden Hinweise zur weiteren Optimierung liefern. Somit stellen die Hydroxylamine die vielversprechendste Substanzklasse dieser Arbeit für die Weiterentwicklung eines hoch potenten Inhibitors gegen die HIV-Protease dar.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Allgemeine Anmerkungen

Im gesamten Kapitel 5 wird, der Übersicht halber und an die gängige Verwendung in der Analytik angepasst, der Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet.

NMR-Spektroskopie

Die Substanzen wurden in kommerziell erhältlichen deuterierten Lösungsmitteln gelöst und die NMR-Spektren an einem supraleitenden Multiresonanzspektrometer der Firma *Jeol Inc.* (USA) vom Typ ECX (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) in der NMR-Abteilung des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind als ppm angegeben und als interner Standard wurde generell das zentrale Signal des eingesetzten Lösungsmittels verwendet. Dabei wurden die folgenden Referenzen genutzt: CDCl_3 ^1H : $\delta = 7.24$ ppm, ^{13}C : $\delta = 77.0$ ppm; $\text{DMSO-}d_6$: $\delta = 2.49$ ppm, ^{13}C : $\delta = 39.5$ ppm, $\text{MeOH-}d_4$: $\delta = 3.31$ ppm, ^{13}C : $\delta = 49.0$ ppm.

Rotamere werden, wenn nicht explizit erwähnt, grundsätzlich nicht aufgeführt. Für die Signalmultiplizitäten in ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

s	Singulett
sbr	breites Singulett
d	Dublett
t	Triplett
q	Quartett
m	Multiplett
mbr	breites Multiplett
ms	symmetrisches Multiplett
br	breites Signal
ps	Pseudosignal

Die entsprechenden Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Die ^{13}C -Spektren wurden je nach Substanz als COM- (engl. *Single Pulse **C**omplete Decoupling Experiment*) und/oder als APT-Spektrum (engl. **A**ttached **P**roton **T**est) aufgenommen. Die Spektrenbearbeitung erfolgte mittels der Software Delta 5.0.0 der Firma *Jeol Inc.* (USA). Konnten Signale in den erhaltenen Spektren nicht zweifelsfrei zugeordnet werden, sind diese durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Bestimmungen wurden in der Abteilung für Massenspektrometrie am Fachbereich Pharmazie der Phillips-Universität Marburg aufgenommen. Erfolgte die Ionisierung über die Elektronenstoß-Methode (EI) wurde ein doppelfokussierendes Sektorfeld-Spektrometer vom Typ VG 7070 der Firma *Generators* verwendet. Die Aufnahmen von ESI-Spektren (engl. *Electron spray ionisation*: ES+) wurden an einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Spektrometer mit EBE-Geometrie vom Typ VG-Autospec der Firma *Micromass* durchgeführt.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden in der entsprechenden Abteilung am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg an einem Micro Cube der Firma *Elementar Analysen GmbH* bestimmt.

Schmelzpunkte

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert und wurden an einem Schmelzpunktgerät des Typs KSP1N der Firma *A. Krüss Optronic GmbH* bestimmt.

Chromatographie

Erfolgte die säulenchromatographische Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (FC), wurde Kieselgel 60 der Firma *Macherey und Nagel* (Korngröße 0.04-0.063) verwendet. Wurde die Aufreinigung mittels MPLC (*Medium Pressure Liquid Chromatography*) durchgeführt, wurde eine Sepacore-MPLC der Firma *Büchi* mit kommerziell erhältlichen Kartuschen (puriFlash 30 μm) der Firma *Interchim* genutzt. Dünnschichtchromatographie wurde auf Aluminiumplatten mit Kieselgel 60 der Firma

Merck KGaA durchgeführt und mittels UV-Absorption oder durch Anfärbung mit geeigneten Färbereagenzien detektiert.

Chemikalien und Reaktionen

Falls nicht anders vermerkt, wurden Lösungsmittel in p.a.-Qualität oder wasserfrei ohne weitere Aufarbeitung verwendet. THF wurde nach einer Vorschrift von Williams *et al.* getrocknet. [148] Sämtliche feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten und unter Argon-Atmosphäre durchgeführt.

Enzym-Assay der HIV-Protease mit BSA

Der Enzym-Assay wurde in 172 μl Assaypuffer (100 mM MES, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, pH 5,5) durchgeführt und durch die Zugabe von 4 μl einer 20 μM Substratlösung in DMSO, 4 μl des Inhibitors in DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen und 20 μl HIV-Protease im Assaypuffer auf ein Gesamtvolumen von 200 μl gebracht. Damit ergibt sich eine finale DMSO-Konzentration von 4 μM . Als Substrat wurde das fluorogene Anthranilyl-HIV-Protease-Substrat (Abz-Thr-Ile-Nle-(*p*-NO₂-Phe)-Gln-Arg-NH₂) verwendet, das bei *Bachem* kommerziell erhältlich ist. Die katalytische Spaltung des Substrats kann durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet und analysiert werden (Anregungswellenlänge: 337 nm; Emissionsbereich: 410 nm). Die Fluoreszenzzunahme wird über einen Zeitraum von mindestens 10 min aufgezeichnet, in dem das Signal linear mit der Zeit zunimmt. [149] Die Substratkonzentration, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist, wird als K_m bezeichnet und wurde für dieses System nach Lineweaver and Burk mit 21,4 μM bestimmt. Weitere Auswertverfahren wie Eadie-Hofstee und Dixon-Hanes-Woolf wurden ebenfalls durchgeführt, um die Fehleranfälligkeit der Auswertung auszugleichen.

Kinetik-Assay mit 0,001 % Triton X-100

Dieser Enzym-Assay wird analog zur BSA-Methode durchgeführt, allerdings wird das BSA durch Triton X-100 ersetzt. Triton X-100 ist mit einer kritischen Mizellenkonzentration (CMC) von 0,5 mM ein effektives Detergenz.

Enzym-Assay des Endothiapepsins mit 0,001 % Tween20

Der Endothiapepsin-Assay wurde von Steffanie Dörr, Nina Klee und Barabara Wienen in Anlehnung an die Vorschrift des HIV-Protease-Assays durchgeführt.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Estersynthese durch Kupplung des Piperidin-Diols **55** mit Carbonsäuren

330 mg des Piperidin-Diols **55** (1.5 mmol, 1 eq) wurden zusammen mit 3.15 mmol (2.1 eq) der Carbonsäure und 12 mg (0.098 mmol, 0.07 eq) DMAP in 10 ml DCM gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt, anschließend mit 604 mg (3.15 mmol, 2.1 eq) EDC versetzt, eine weitere Stunde im Eisbad und schließlich 12 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 ml H₂O und 20 ml EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wurde noch mit 3x15 ml EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaHCO₃- (3x10 ml) sowie ges. NaCl-Lösung (3x10 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotavapor bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels MPLC aufgereinigt.

AAV2: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

1.0 mmol der Boc-geschützten Verbindung wurde in 2 ml Et₂O (alternativ auch DCM) gelöst und bei RT unter Argon mit 5 ml einer 2 M HCl-Lösung in Et₂O versetzt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das ausgefallene Hydrochlorid abfiltriert, dreimal mit trockenem Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Falls erforderlich, erfolgte die Aufreinigung über eine MPLC.

AAV3: Herstellung von Sulfonamiden

8.17 mmol (1 eq) des Amins wurden in 80 ml trockenem DCM gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden DIPEA (9.80 mmol, 1.2 eq) sowie das entsprechende Sulfonylchlorid (8.99 mmol, 1.1 eq) so zugesetzt, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von 120 ml H₂O und 120 ml TBME wurden die wässrige Phase mit 3x60 ml EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-

Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mittels MPLC aufgereinigt.

AAV4: N-Alkylierung von Mono- bzw. Bis-Sulfonamiden in Aceton/Acetonitril

Das Sulfonamid (3.0 mmol, 1 eq) wurde in 20 ml trockenem Aceton gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 4.5 mmol (1.5 eq) bzw. 9 mmol (3 eq) Cs_2CO_3 versetzt. Nach 5 min wurde das Bromid (3.6 mmol, 1.2 eq bzw. 7.2 mmol, 2.4 eq) portionsweise zugegeben und für weitere 3 h im Eisbad gerührt. Anschließend wurde auf RT aufgewärmt und über Nacht die Reaktion vervollständigt. Nach Zugabe von 25 ml H_2O wurde mit EtOAc (3x30 ml) extrahiert, mit 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels MPLC.

AAV5: TBS-Entschützung mit TBAF

Das Edukt (22.5 mmol, 1 eq) wurde in 100 ml trockenem THF gelöst und vor der tropfenweisen Zugabe von 27 ml (27 mmol, 1.2 eq) 1M TBAF-Lösung in THF im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Das Eisbad wurde nach 1 h entfernt und weiter über Nacht bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels MPLC aufgereinigt.

AAV6: Nitril-Hydrolyse zum Amid

Das Nitril (5.49 mmol) wurde in 54 ml DMSO gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt, sodass das DMSO gefror. Anschließend wurden 27 ml einer 30%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung sowie 379 mg (2.74 mmol, 0.5 eq) wasserfreies Kaliumcarbonat zugesetzt. Der Ansatz wurde im Eisbad langsam auf RT aufgewärmt und anschließend weitere 4 h gerührt. Die Lösung wurde nun mit 200 ml H_2O versetzt und der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, mit H_2O gewaschen und getrocknet. Falls das auf diesem Weg erhaltene Produkt noch nicht die ausreichende Reinheit besaß, wurde es über MPLC aufgereinigt.

AAV7: Reduktive Aminierung

Das Amin (0.32 mmol) wurde in 5 ml trockenem Methanol unter Argonatmosphäre gelöst und 78 mg pulverisiertes Molekularsieb zugegeben. Anschließend wurden 1.89 mmol (6 eq) des Aldehyds zugegeben und nach 3 h bei RT wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und vorsichtig mit 96 mg (2.5 mmol, 8 eq) NaBH₄ versetzt. Nach weiteren 2 h wurde mit H₂O gequentscht, filtriert, das Filtrat unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt und der Rückstand mittels MPLC aufgereinigt.

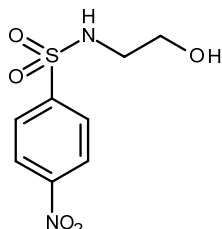
AAV8: N-Alkylierung von Aminen mit Bromiden

5.3 ml trockenes DMF und 0.31 mmol (1 eq) des Amins wurden unter Argon im Zweihalskolben vorgelegt und bei 0 °C mit 0.38 mmol (1.2 eq) Cs₂CO₃ versetzt. Anschließend wurden 0.38 mmol (1.2 eq) Bromid langsam zugegeben und für weitere 3 h im Eisbad gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurden 30 ml H₂O und 30 ml EtOAc zugesetzt und noch mit 3x30 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der resultierende Rückstand wurde mittels MPLC aufgereinigt.

5.3 Experimentelle Daten der synthetisierten Verbindungen

Zwischenstufen, deren analytische Daten nicht explizit aufgeführt sind, wurden über ^1H -NMR sowie Massenspektrometrie analysiert.

N-(2-Hydroxyethyl)-4-nitro-benzylsulfonamid (20a)

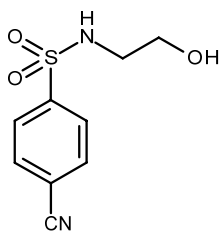


In Anlehnung an die **AAV3** wurden 1.48 ml (24.56 mmol, 1 eq) 2-Aminoethanol mit 4.82 ml (34.38 mmol, 1.4 eq) Triethylamin sowie 5.17 g (23.33 mmol, 0.95 eq) 4-Nitrobenzensulfonylchlorid umgesetzt. Das gewünschte Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung als hellbraunes Pulver (5.8 g, 23.55 mmol) mit einer Ausbeute von 96 % erhalten.

Ausbeute	5.8 g (23.55 mmol, 96 %)
	hellbraunes Pulver
^1H-NMR (400 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 8.41 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz - SO_2CCHCH); 8.05 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, - SO_2CCH); 8.00 (t, 1H, $^3J = 5.1$ Hz, -NH); 4.69 (t, 1H, $^3J = 5.5$ Hz, -OH); 3.37 (dt, $^3J = 5.8$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, HOCH_2); 2.86 (dt, $^3J = 5.8$ Hz, $^3J = 5.9$ Hz, - NHCH_2).
^{13}C-NMR APT (100.53 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 150.0 ($\text{NO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 146.9 (- $\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 128.6 (- SO_2CCH); 125.0 (- SO_2CCHCH); 60.4 (- CH_2OH); 45.7 (- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 264.1 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$); 269.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); 510 ($[\text{2M}+\text{NH}_4]^+$); 515 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5\text{SNa}$): m/z = 269.020813 gefunden: 269.024249
EA	berechnet für: C: 39.02 % H: 4.09 % N: 11.38 % gefunden: C: 39.44 % H: 4.25 % N: 11.33 %

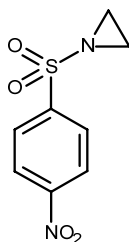
Smp. | 138.5-140 °C

4-Cyano-*N*-(2-hydroxyethyl)benzylsulfonamid (20b)



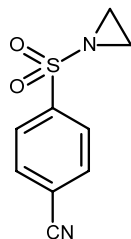
In Anlehnung an die **AAV3** wurden 1.48 ml (24.56 mmol, 1 eq) 2-Aminoethanol mit 4.82 ml (34.38 mmol, 1.4 eq) Triethylamin sowie 4.70 g (23.33 mmol, 0.95 eq) 4-Cyanobenzensulfonylchlorid umgesetzt. Das gewünschte Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung als farbloser Feststoff (5.1 g, 22.54 mmol, 92 %) erhalten.

Ausbeute	5.1 g (22.54 mmol, 92 %)
	farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.08 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCH <u>H</u>); 7.88 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH <u>H</u>); 7.93 (t, 1H, $^3J = 5.7$ Hz, -NH <u>H</u>); 4.70 (t, 1H, $^3J = 5.5$ Hz, -OH <u>H</u>); 3.37 (dt, $^3J = 5.8$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, HOCH <u>H</u> ₂); 2.86 (dt, $^3J = 6.0$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, -NHCH <u>H</u> ₂).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 145.5 (-SO ₂ C <u>A</u> r); 133.9 (-SO ₂ CCHCH <u>H</u>); 127.8 (-SO ₂ C <u>C</u> H); 118.3 (NCC <u>A</u> r); 115.3 (- <u>C</u> N); 60.4 (-CH <u>2</u> OH); 45.7 (-CH <u>2</u> CH ₂ OH).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 244.1 ([<i>M</i> +NH ₄] ⁺); 249.2 ([<i>M</i> +Na] ⁺); 470.2 ([2 <i>M</i> +NH ₄] ⁺); 475.1 ([2 <i>M</i> +Na] ⁺).
HR-MS	berechnet für (C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₃ S): m/z = 244.075588
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 244.076544
EA	berechnet für: C: 47.78 % H: 4.45 % N: 12.38 % gefunden: C: 48.04 % H: 4.63 % N: 12.23 %
Smp.	83.5-84 °C

1-(4-Nitrophenyl)sulfonylaziridin (22a)

7.6 g (29.01 mmol, 1.2 eq) Triphenylphosphin wurden in 200 ml trockenem THF unter Argon gelöst und im Eis-Salzbad auf -15°C gekühlt. Anschließend wurden 4.77 ml (30.43 mmol, 1.25 eq) Diethylazodicarboxylat so zugetropft, dass die Temperatur -10°C nicht überschritt. Nach 30 min wurden 6.00 g (24.37 mmol, 1eq) Alkohol **20a** in einer Portion zum Reaktionsansatz gegeben. Nach weiteren 5 h im Eisbad ($T \leq 0^{\circ}\text{C}$) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der klebrige Rückstand vorsichtig auf Kieselgel aufgezogen. Die Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc, 3.5:1) erfolgte im direkten Anschluss an die Reaktion. Das gewünschte Produkt **22a** wurde als leicht gelblicher Feststoff (16.21 mmol, 3.70 g, 67 %) erhalten.

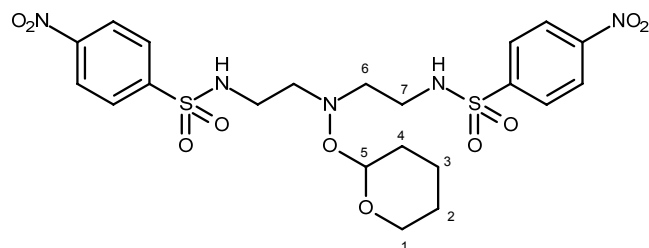
Ausbeute	3.7 g (16.21 mmol, 67 %)
	leicht gelblicher Feststoff
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 8.41 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.8$ Hz - SO_2CCHCH); 8.17 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, - SO_2CCH); 2.49 (s, 4H, - NCH_2).
$^{13}\text{C-NMR APT}$ (100.53 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 150.7 ($\text{NO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 143.8 (- $\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 129.3 (- SO_2CCH); 124.4 (- SO_2CCHCH); 28.1 (- NCH_2).
MS (EI+, 70 eV)	m/z = 228 (7 [M^+]); 186 (10); 122 (46); 92 (30); 75 (100); 63 (20).
HR-MS (EI+, 70 eV)	berechnet für ($\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$): m/z = 228.020479 gefunden: 228.023445
EA	berechnet für: C: 42.10 % H: 3.53 % N: 12.27 % gefunden: C: 42.15 % H: 3.63 % N: 12.24 %
Smp.	129.5-131 $^{\circ}\text{C}$

4-(Aziridin-1-ylsulfonyl)benzonitril (22b)

5.56 g (21.23 mmol, 1.2 eq) Triphenylphosphin wurde unter Argon in 160 ml trockenem THF gelöst und im Eis-Salzbad auf -15°C gekühlt. 3.47 ml (22.10 mmol, 1.25 eq) Diethylazodicarboxylat wurden tropfenweise zugegeben, so dass die Temperatur -10°C nicht überstieg. Der Ansatz wurde für 30 min gerührt und anschließend mit 4.00 g (17.68 mmol, 1 eq) Alkohol **20b** versetzt. Nach weiteren 5 h im Eisbad ($T \leq 0^{\circ}\text{C}$) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc, 4:1) aufgereinigt. Das Aziridin **22b** wurde als schneeweißer Feststoff (2.8 g, 13.46 mmol, 76%) isoliert.

Ausbeute	2.8 g (13.46 mmol, 76 %)
	schneeweißer Feststoff
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 8.08 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 7.86 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 2.46 (s, 4H, $-\text{NCH}_2$).
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.53 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 142.4 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 133.0 ($-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 128.7 ($-\text{SO}_2\text{CCH}$); 117.5 (NCC_{Ar})*; 117.3 ($-\text{CN}$)*; 28.1 ($-\text{NCH}_2$).
MS (EI, 70 eV)	m/z = 208 (23, $[M^+]$); 195 (91); 166 (79); 102 (100); 74 (24).
HR-MS	berechnet für $(\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S})$: m/z = 208.030649
(EI, 70 eV)	gefunden: 208.032915
EA	berechnet für: C: 51.91 % H: 3.87 % N: 13.45 %
	gefunden: C: 51.85 % H: 4.02 % N: 13.46 %
Smp.	105-106 $^{\circ}\text{C}$

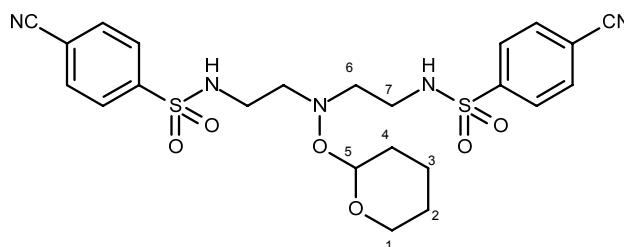
4-Nitro-*N*-[2-[2-[(4-nitrophenyl)sulfonylamino]ethyl-tetrahydropyran-2-yloxy-amino]ethyl]benzylsulfonamid (23a)



370 mg *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (3.16 mmol, 1 eq) und 1.8 g Aziridin **22a** (7.89 mmol, 2.5 eq) wurden in 15 ml Chloroform gelöst und anschließend für 4 Tage unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt und der Rückstand mittels MPLC (EtOAc in *cyclo*-Hexan 22% bis 50%) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **23a** wurde in Form eines leicht gelben Pulvers (1.40 g, 2.44 mmol, 78 %) erhalten.

Ausbeute	1.40 g (2.44 mmol, 78%) leicht gelbes Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.42 (d, 4H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.9 Hz, -SO ₂ CCHCH); 8.05 (d, 4H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 9.2 Hz, -SO ₂ CCH); 7.90-7.84 (sbr, 2H, -SO ₂ NH); 4.52 (dd, 1H, ³ <i>J</i> = 6.4 Hz, ³ <i>J</i> = 2.8 Hz, H5); 3.62 (mbr, 1H, H1 _A); 3.29 (mbr, 1H, H1 _B); 2.96 (mbr, 4H, H7); 2.70 (tbr, 4H, ³ <i>J</i> = 6.2 Hz, H6); 1.64-1.15 (m, 6H, -CH ₂ , H2, H3, H4).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 149.5 (-SO ₂ CCHCH); 146.0 (-SO ₂ C _{Ar}); 128.0 (-SO ₂ CCH); 124.5 (-SO ₂ CCHCH); 102.2 (C5); 63.1 (C1); 57.9 (C6); 57.8 (C7); 29.0, 24.6, 20.2 (C2, C3, C4).
MS (ES ⁺ , RT)	<i>m/z</i> = 574 ([<i>M</i> +H] ⁺); 591 ([<i>M</i> +NH ₄] ⁺); 596 ([<i>M</i> +Na] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₁₀ S ₂ Na): <i>m/z</i> = 596.109706 gefunden: 596.110841
EA	berechnet: C: 43.97 % H: 4.74 % N: 12.21 % gefunden: C: 44.08 % H: 4.88 % N: 12.27 %
Smp.	147 °C

4-Cyano-*N*-[2-[2-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]ethyl-tetrahydropyran-2-yloxy-amino]ethyl]benzensulfonamid (23b)

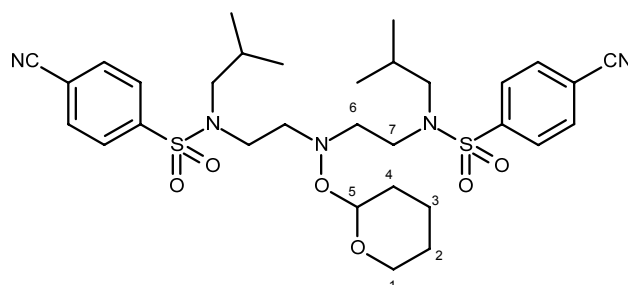


500 mg (2.40 mmol, 2.5 eq) Aziridin **22b** wurde zusammen mit 113 mg (0.96 mmol, 1 eq) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin in 7 ml Chloroform gelöst und für 4 Tage unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels MPLC (EtOAc in *cyclo*-Hexan 22% bis 50%) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt wurde in Form farbloser Kristalle (390 mg, 0.73 mmol, 77%) gewonnen.

Ausbeute	390 mg (0.73 mmol, 77%) farblose Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.08 (dt, 4H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.95 (dt, 4H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.78 (sbr, 2H, -SO ₂ NH); 4.49 (dd, 1H, $^3J = 6.5$ Hz, $^3J = 2.6$ Hz, -NOCH); 3.60 (m, 1H, -OCH ₂); 3.26 (m, 1H, -OCH ₂); 2.98- 2.89 (m, 4H, -NHCH ₂); 2.67 (t, 4H, $^3J = 6.4$ Hz, -NCH ₂); 1.57 (m, 1H, CH ₂ THP)*; 1.43-1.28 (m, 4H, CH ₂ THP)*; 1.17 (m, 1H, CH ₂ THP)*.
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 144.5 (-SO ₂ C _{Ar}); 133.4 (-SO ₂ CCHCH); 127.2 (-SO ₂ CCH); 117.6 (-C _{Ar} CN); 114.8 (-CN); 102.1 (C5); 63.0 (C1); 57.9 (C6); 57.8 (C7); 29.0 (C4); 24.6 (C2); 20.2 (C3).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 534 ([<i>M</i> +H] ⁺); 551 ([<i>M</i> +NH ₄] ⁺); 556 ([<i>M</i> +Na] ⁺); 1067 ([2 <i>M</i> +H] ⁺) 1084 ([2 <i>M</i> +NH ₄] ⁺); 1089 ([2 <i>M</i> +Na] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₆ S ₂ Na): m/z = 556.130047 gefunden: 556.128088
EA	berechnet für *½H ₂ O: C: 50.91 % H: 5.20 % N: 12.91 % gefunden: C: 50.95 % H: 5.24 % N: 12.57 %

Smp. | 115 °C

4-Cyano-N-[2-[2-[(4-cyanophenyl)sulfonyl-isobutyl-amino]ethyl-tetrahydropyran-2-yloxy-amino]ethyl]-N-isobutyl-benzylsulfonamid (27a)



In 2 ml trockenem Acetonitril wurden 150 mg (0.28 mmol, 1 eq) **23b** gelöst und mit 274 mg (0.84 mmol, 3 eq) Cs_2CO_3 , 74 μl (0.68 mmol, 2.4 eq) 1-Brom-2-methylpropan sowie katalytischen Mengen KI bei 65 °C zur Reaktion gebracht. Nach 12 h wurden zusätzliche 74 μl (0.68 mmol, 2.4 eq) 1-Brom-2-methylpropan zur Reaktionslösung getropft und für weitere 12 h auf 65 °C erhitzt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis das Startmaterial nach DC- Kontrolle vollständig umgesetzt worden war. Anschließend wurde mit 10 ml H_2O verdünnt und mit EtOAc (3x10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Mittels MPLC (20 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) wurde der Rückstand aufgereinigt und das Produkt in Form eines gelben Öls (130 mg, 0.20 mmol, 72 %) isoliert.

Ausbeute | 130 mg (0.20 mmol, 72 %)

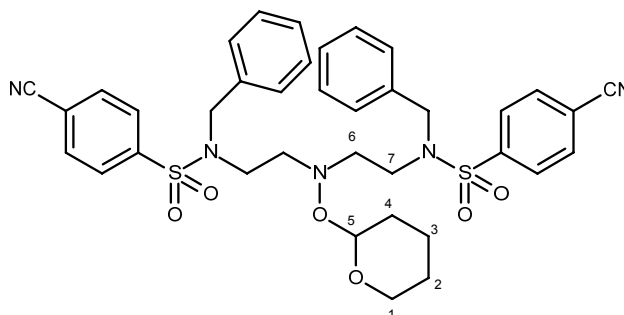
gelbes Öl

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 7.94 (d, 4H, $^3J = 8.6$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 7.82 (d, 4H, $^3J = 8.6$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 4.59 (dd, 1H, $^3J = 7.2$ Hz, $^3J = 2.6$ Hz, $-\text{NOCH}$); 3.85 (ms, 1H, $-\text{NOCH}$); 3.45 (ms, 1H, $-\text{OCH}_2$); 3.36 (ddd, 2H, $^2J = 14.6$ Hz, $^3J = 9.4$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, $-\text{ONCH}_2\text{CH}_2\text{N}$)*; 3.21 (ddd, 2H, $^2J = 14.5$ Hz, $^3J = 9.6$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, $-\text{ONCH}_2\text{CH}_2\text{N}$)*; 3.04 (ddd, 2H, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, $-\text{ONCH}_2\text{CH}_2\text{N}$)*; 2.98 (ms, 2H, $-\text{ONCH}_2\text{CH}_2\text{N}$)*; 2.97 (dd, 2H, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2.91 (dd, 2H, $^2J = 13.5$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz,

	-NCH ₂ CH(CH ₃) ₂ ; 1.88 (ms, 2H, -CH(CH ₃) ₂); 1.78 (ms, 1H, CH ₂ THP)*; 1.65 (ms, 1H, CH ₂ THP)*; 1.54-1.46 (m, 2H, CH ₂ THP)*; 1.42-1.37 (m, 2H, CH ₂ THP)*; 0.89 (dd, 12H, ² J = 15.2 Hz, ³ J = 2.0 Hz, -CH(CH ₃) ₂).
¹³C-NMR (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 143.7 (-SO ₂ C _{Ar}); 133.0 (-SO ₂ CCHCH); 127.9 (-SO ₂ CCH); 117.4 (-C _{Ar} CN); 116.3 (-CN); 103.2 (C5); 64.5 (C1); 58.4 (-NCH ₂ CH); 57.2 (C6); 46.3 (C7); 29.8 (C4); 27.1 (-CH(CH ₃) ₂); 25.2 (C2); 21.2 (C3); 20.0 (-CH(CH ₃) ₂).
MS (ES+, RT)	m/z = 646 ([M+H] ⁺); 668 ([M+Na] ⁺).
HR-MS (ES+, RT)	berechnet für (C ₃₁ H ₄₃ N ₅ O ₆ S ₂ Na): m/z = 668.255248 gefunden: 668.257270

N-Benzyl-N-[2-[2-[benzyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]ethyl-tetrahydropyran-2-yloxy-amino]ethyl]-4-cyano-benzylsulfonamid (27b)



Der **AAV4** folgend ergab nach Reaktion von 180 mg (0.34 mmol) **23b** mit 328 mg (1.01 mmol) Cs₂CO₃ und 96 µl (0.91 mmol) Benzylbromid das zweifach alkylierte Produkt als farblosen Feststoff (140 mg, 0.20 mmol, 60 %) nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 3:1).

Ausbeute

140 mg (0.20 mmol, 60 %)

farbloser Feststoff

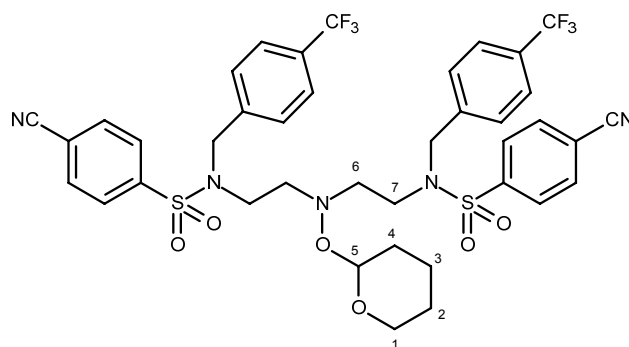
¹H-NMR

(400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 7.90 (d, 4H, ³J + ⁵J = 8.9 Hz, -SO₂CCH); 7.78 (d, 4H, ³J + ⁵J = 8.6 Hz, -SO₂CCHCH); 7.31-7.27 (m, 6H, -CH₂CCHCH, -CH₂CCHCHCH); 7.19-7.16 (m, 4H, -CH₂CCH); 4.41 (dd, 1H, ³J = 6.6 Hz, ³J = 2.9 Hz, -NOCH); 4.37 (d, 2H, ²J = 14.9 Hz, -CH₂C_{Ar}); 4.32 (d, 2H, ³J = 14.9 Hz,

	$-\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$; 3.65 (ms, 1H, $-\text{OCH}_2$); 3.34 (ddd, 2H, $^2J = 14.7$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, $-\text{ONCH}_2\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{N}}$)*; 3.29 (m, 1H, $-\text{OCH}_2$); 3.18 (ddd, 2H, $^2J = 14.3$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, $-\text{ONCH}_2\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{N}}$)*; 2.74 (ddd, 2H, $^2J = 13.5$ Hz, $^3J = 9.2$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, $-\text{ONCH}_2\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{N}}$)*; 2.62 (ddd, 2H, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 9.0$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, $-\text{ONCH}_2\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{N}}$)*; 1.70-1.61 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{THP}}$)*; 1.48-1.38 (m, 4H, $\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{THP}}$)*; 1.27-1.19 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{THP}}$)*.
^{13}C-NMR APT (100.53 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 144.2 ($-\text{SO}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$); 135.5 ($-\text{CH}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$); 133.1 ($-\text{SO}_2\underline{\text{CCHCH}}$); 128.9 ($-\text{CH}_2\underline{\text{CCHCH}}$); 128.5 ($-\text{SO}_2\underline{\text{CCH}}$); 128.3 ($-\text{CH}_2\underline{\text{CCH}}$); 127.9 ($-\text{CH}_2\underline{\text{CCHCHCH}}$); 117.5 ($-\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\underline{\text{CN}}$); 116.4 ($-\underline{\text{CN}}$); 102.8 (C5); 64.1 (C1); 57.5 ($-\underline{\text{CH}}_2\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$); 52.5 (C6); 45.2 (C7); 29.6 (C4); 25.2 (C2); 20.8 (C3).
MS (ES+, RT)	$m/z = 714$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$); 736 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).
HR-MS	berechnet für ($\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$): $m/z = 736.223948$
(ES+, RT)	gefunden: 736.223256
EA	berechnet für: C: 62.25 % H: 5.51 % N: 9.81 % gefunden: C: 62.19 % H: 5.73 % N: 9.33 %
Smp.	77 °C

4-Cyano-*N*-[2-[2-[(4-cyanophenyl)sulfonyl]-[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino]ethyl-tetrahydropyran-2-yloxy-amino]ethyl]-*N*-[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl] benzylsulfonamid (27c)



Die Verwendung der **AAV4** ergab nach Reaktion von 180 mg (0.34 mmol) **23b** mit 328 mg (1.01 mmol) Cs_2CO_3 und 194 mg (0.91 mmol) 4-(Trifluormethyl)benzylbromid

das zweifach alkylierte Produkt als farblosen Feststoff (175 mg, 0.21 mmol, 61 %) nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 3:1).

Ausbeute	175 mg (0.21 mmol, 61 %)
	farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.91 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.6$ Hz, -SO ₂ CCH $\underline{\text{H}}$); 7.81 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.6$ Hz, -SO ₂ CCHCH $\underline{\text{H}}$); 7.56 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.3$ Hz, CF ₃ CCH $\underline{\text{H}}$)*; 7.33 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.0$ Hz, CF ₃ CCHCH $\underline{\text{H}}$)*; 4.43 (d, 2H, $^2J = 15.2$ Hz, -CH $\underline{2}$ C _{Ar}); 4.39 (d, 2H, $^3J = 15.2$ Hz, -CH $\underline{2}$ C _{Ar}); 4.37 (ms, -NOCH $\underline{\text{H}}$); 3.62 (ms, 1H, -OCH $\underline{2}$); 3.36 (ddd, 2H, $^2J = 14.5$ Hz, $^3J = 8.7$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, -ONCH $\underline{2}$ CH $\underline{2}$ N)*; 3.28 (ms, 1H, -OCH $\underline{2}$); 3.18 (ddd, 2H, $^2J = 14.3$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, -ONCH $\underline{2}$ CH $\underline{2}$ N)*; 2.77 (ddd, 2H, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, -ONCH $\underline{2}$ CH $\underline{2}$ N)*; 2.65 (ddd, 2H, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, -ONCH $\underline{2}$ CH $\underline{2}$ N)*; 1.65 (ms, 1H, CH $\underline{2}$ THP)*; 1.48-1.36 (m, 4H, CH $\underline{2}$ THP)*; 1.16 (m, 1H, CH $\underline{2}$ THP)*.
¹³C-NMR (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 143.7 (-SO $\underline{2}$ C _{Ar}); 139.9 (-CH $\underline{2}$ C _{Ar}); 133.2 (-SO $\underline{2}$ CCHCH $\underline{\text{H}}$); 130.6 (q, $^2J = 31.8$ Hz, CF $\underline{3}$ C _{Ar}); 128.6 (-SO $\underline{2}$ CCH $\underline{\text{H}}$); 127.9 (-CH $\underline{2}$ CCH $\underline{\text{H}}$); 125.8 (q, $^3J = 2.9$ Hz, -CH $\underline{2}$ CCHCH $\underline{\text{H}}$); 124.0 (q, $^1J = 272.6$ Hz, -CF $\underline{3}$); 117.3 (-C _{Ar} CN); 116.7 (-CN); 103.1 (C5); 64.3 (C1); 57.5 (-CH $\underline{2}$ C _{Ar}); 52.2 (C6); 45.6 (C7); 29.6 (C4); 25.1 (C2); 20.9 (C3).
MS (ES+, RT)	$m/z = 872.2$ ($[M+\text{Na}]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₃₉ H ₃₇ F ₆ N ₅ O ₆ S ₂ Na): $m/z = 872.198717$
(ES+, RT)	gefunden: 872.198283
EA	berechnet für *½H ₂ O: C: 54.54 % H: 4.46 % N: 8.15 %
	gefunden: C: 54.90 % H: 4.91 % N: 7.69 %
Smp.	82 °C

4-[2-[2-[(4-Carbamoylphenyl)sulfonyl-*isobutyl*-amino]ethyl-hydroxy-amino]ethyl-*isobutyl*-sulfamoyl]benzamid (28a)

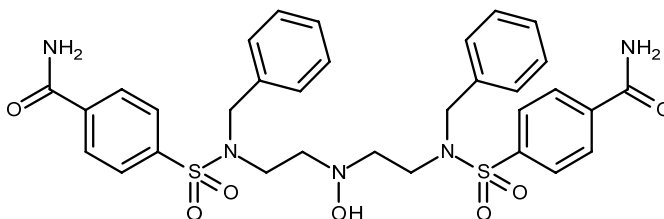


In Anlehnung an **AAV6** wurden 90 mg (0.14 mmol) der THP-geschützten Verbindung **27a** mit 1.5 ml einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung und 95 mg (0.70 mmol) K_2CO_3 zur Reaktion gebracht und das ausgefällte Carboxamid (70 mg, 0.10 mmol, 74 %) ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde das Zwischenprodukt in 5 ml trockenem EtOH suspendiert, mit 27 mg (0.10 mmol, 1 eq) PPTS versetzt und für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Rückstand über eine MPLC (5 % MeOH in DCM) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **28a** wurde als ein leicht beiges Pulver (42 mg, 0.070 mmol) in einer Ausbeute von 68 % isoliert.

Ausbeute	42 mg (0.070 mmol, 68 %)
	leicht beiges Pulver
1H-NMR (400 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 8.15 (sbr, 2H, -CONH ₂); 8.04 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.84 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.84 (s, 1H, -OH); 7.58 (sbr, 2H, -CONH ₂); 3.17 (t, 4H, $^3J = 7.8$ Hz, HO-NCH ₂ CH ₂ N)*; 2.89 (d, 4H, $^3J = 7.3$ Hz, -NCH ₂ CH(CH ₃) ₂); 2.64 (t, 4H, $^3J = 7.3$ Hz, HO-NCH ₂ CH ₂ N)*; 1.82 (m, 2H, -CH(CH ₃) ₂); 0.83 (d, 12H, $^3J = 6.6$ Hz, -CH(CH ₃) ₂).
^{13}C-NMR (100.53 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 166.6 (-CONH ₂); 141.2 (-SO ₂ C _{Ar}); 137.9 (-SO ₂ CCHCH); 128.4 (-SO ₂ CCHCH); 126.8 (-SO ₂ CCH); 59.1 (HONCH ₂); 56.4 (HONCH ₂ CH ₂); 46.4 (-NCH ₂ CH); 26.6 (-CH(CH ₃) ₂); 19.7 (-CH(CH ₃) ₂).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 598.2 ($[M+H]^+$); 620.2 ($[M+Na]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₂₆ H ₄₀ N ₅ O ₇ S ₂): m/z = 598.236918
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 598.234319

EA	berechnet für *1½H ₂ O: C: 49.98 % H: 6.78 % N: 11.21 %
	gefunden: C: 50.12 % H: 6.40 % N: 10.60 %
Smp.	98 °C

4-[Benzyl-[2-[2-[benzyl-(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-amino]ethyl-hydroxy-amino]ethyl]sulfamoyl]benzamid (28b)

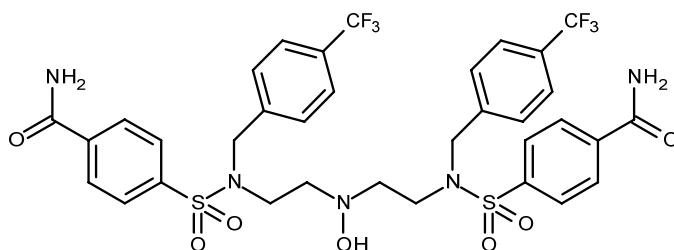


In Anlehnung an **AAV6** wurden 78 mg (0.14 mmol) der THP-geschützten Verbindung **27b** mit 1.5 ml 30%iger Wasserstoffperoxid-Lösung und 97 mg (0.70 mmol) K₂CO₃ zur Reaktion gebracht und das ausgefällte Carboxamid (75 mg, 0.10 mmol, 71 %) ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde das Zwischenprodukt in 5 ml trockenem EtOH suspendiert, mit 27 mg (0.10 mmol, 1 eq) PPTS versetzt und für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Rückstand über eine MPLC (5 % MeOH in DCM) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **28b** wurde als ein farbloses Pulver (59 mg, 0.09 mmol) in einer Ausbeute von 82 % isoliert.

Ausbeute	59 mg (0.09 mmol, 82 %)
	farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.17 (sbr, 2H, -CONH ₂); 8.05 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.6 Hz, -SO ₂ CCH); 7.87 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.6 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.69 (s, 1H, -OH); 7.61 (sbr, 2H, -CONH ₂); 7.32-7.23 (m, 10H, -CH ₂ CCH, -CH ₂ CCHCH, -CH ₂ CCHCHCH); 4.31 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.12 (t, 4H, ³ J = 7.3 Hz, HO-NCH ₂ CH ₂ N)*; 2.27 (t, 4H, ³ J = 7.3 Hz, HO-NCH ₂ CH ₂ N)*.
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 166.6 (-CONH ₂); 141.6 (-SO ₂ C _{Ar}); 138.0 (-CH ₂ C _{Ar}); 136.8 (NH ₂ COC _{Ar}); 128.4 (-SO ₂ CCHCH); 128.3

	(-CH ₂ CCH _{CH}); 127.9 (-SO ₂ CCH); 127.5 (-CH ₂ CCH); 126.8 (-CH ₂ CCHCH _{CH}); 58.2 (HONCH ₂); 51.8 (HONCH ₂ CH ₂); 45.7 (-CH ₂ C _{Ar}).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 666.2 ($[M+H]^+$); 688.2 ($[M+Na]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₃₂ H ₃₅ N ₅ O ₇ S ₂ Na): m/z = 688.187562
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 688.185935
EA	berechnet für *H ₂ O: C: 56.21 % H: 5.45 % N: 10.24 % gefunden: C: 56.59 % H: 5.43 % N: 10.19 %
Smp.	179.5-180 °C

4-[2-[2-[(4-Carbamoylphenyl)sulfonyl-[[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino]ethyl-hydroxy-amino]ethyl-[[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]sulfamoyl]benzamid (28c)

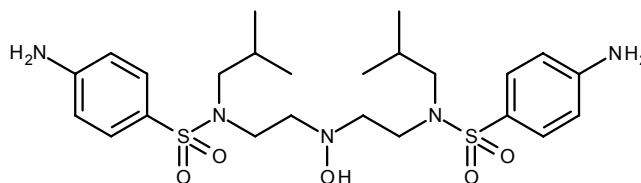


In Anlehnung an **AAV6** wurden 130 mg (0.15 mmol) der THP-geschützten Verbindung **27c** mit 1.5 ml einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung und 106 mg (0.77 mmol) K₂CO₃ zur Reaktion gebracht und das ausgefällte Carboxamid (90 mg, 0.10 mmol, 66 %) ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde das Zwischenprodukt in 5 ml trockenem EtOH suspendiert, mit 27 mg (0.10 mmol, 1 eq) PPTS versetzt und für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Rückstand über eine MPLC (5 % MeOH in DCM) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **28c** wurde als ein farbloses Pulver (57 mg, 0.071 mmol) in einer Ausbeute von 70 % isoliert.

Ausbeute	57 mg (0.071 mmol, 70 %) farbloses Pulver
¹H-NMR	δ [ppm] = 8.17 (sbr, 2H, -CONH ₂); 8.05 (d, 4H,

(400 MHz, D ₆ -DMSO)	$^3J + ^5J = 8.6$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.88 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.8$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.75 (s, 1H, -OH); 7.67 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.0$ Hz, CF ₃ CCH [*]); 7.61 (sbr, 2H, -CONH ₂); 7.48 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.3$ Hz, CF ₃ CCHCH [*]); 4.43 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.17 (t, 4H, $^3J = 7.3$ Hz, HO-NCH ₂ CH ₂ N [*]); 2.37 (t, 4H, $^3J = 7.3$ Hz, HO-NCH ₂ CH ₂ N [*]).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 166.5 (-CONH ₂); 142.2 (-CH ₂ C _{Ar}); 141.2 (-SO ₂ C _{Ar}); 138.1 (NH ₂ CO ₂ C _{Ar}); 128.5 (-SO ₂ CCHCH); 128.3 (-SO ₂ CCH); 128.0 (q, $^2J = 31.8$ Hz, CF ₃ C _{Ar}); 126.9 (CF ₃ C _{Ar} CHCH); 125.1 (d, $^3J = 4.0$ Hz, CF ₃ C _{Ar} CH); 124.2 (q, $^1J = 271.65$, -CF ₃); 58.4 (HONCH ₂); 51.5 (HONCH ₂ CH ₂); 46.3 (-CH ₂ C _{Ar}).
MS (ES+, RT)	$m/z = 802.0$ ([M+H] ⁺); 824.2 ([M+Na] ⁺).
HR-MS	berechnet für (C ₃₄ H ₃₃ F ₆ N ₅ O ₇ S ₂ Na): $m/z = 824.162332$
(ES+, RT)	gefunden: 824.165460
EA	berechnet für *½H ₂ O: C: 50.37 % H: 4.23 % N: 8.64 % gefunden: C: 50.38 % H: 4.35 % N: 8.50 %
Smp.	204-205 °C

4-Amino-*N*-[2-[2-[(4-aminophenyl)sulfonyl-*isobutyl*-amino]ethyl-hydroxy-amino]ethyl]-*N*-*isobutyl*-benzensulfonamid (30a)

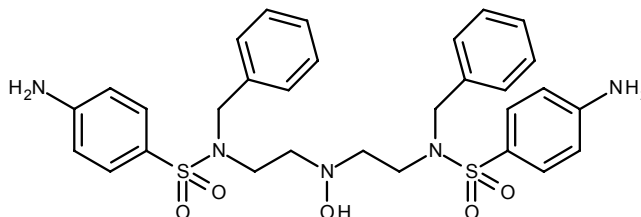


In 3 ml trockenem Acetonitril wurden 150 mg (0.26 mmol, 1 eq) **23a** gelöst und mit 92 mg (0.79 mmol, 3 eq) Cs₂CO₃, 68 µl (0.63 mmol, 2.4 eq) 1-Brom-2-methylpropan sowie katalytischen Mengen KI bei 65 °C zur Reaktion gebracht. Nach 12 h Rühren wurden zusätzliche 68 µl (0.63 mmol, 2.4 eq) 1-Brom-2-methylpropan zur Reaktionslösung getropft und für weitere 12 h auf 65 °C erhitzt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis das Startmaterial nach DC-Kontrolle vollständig umgesetzt worden war. Anschließend wurde mit 10 ml H₂O verdünnt und mit EtOAc (3x10 ml)

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Mittels MPLC (20 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) wurde der Rückstand aufgereinigt und das Produkt in Form eines gelben Öls (127 mg, 0.19 mmol, 71 %) isoliert. Im direkten Anschluss wurde die alkylierte Verbindung **29a** in 15 ml EtOAc gelöst und für 12 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre mit Palladium als Katalysator hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 8 ml trockenem Ethanol gelöst und zusammen mit 56 mg (0.22 mmol, 2 eq) PPTS für 12 h bei 70 °C zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt **30a** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Gradient: 0 % bis 50 % EtOAc in DCM) als farbloser Feststoff (20 mg, 0.04 mmol, 15 % über drei Stufen) isoliert werden.

Ausbeute	20 mg (0.04 mmol, 15 % über drei Stufen) farbloser Feststoff
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 7.57 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 6.65 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 5.92 (sbr, 1H, -OH); 4.08 (sbr, 4H, $-\text{NH}_2$); 3.26 (t, 4H, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{HO-N-CH}_2\text{CH}_2$); 2.87 (d, 4H, $^3J = 7.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2.77 (t, 4H, $^3J = 6.4$ Hz, HO-N-CH_2); 1.84 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.86 (d, 12H, $^3J = 6.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).
$^{13}\text{C-NMR APT}$ (100.53 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 150.2 ($\text{C}_{\text{q/Ar}}$, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 129.3 (CH_{Ar} , $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 128.0 ($\text{C}_{\text{q/Ar}}$, $-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 114.0 (CH_{Ar} , $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 59.2 (HO-N-CH_2); 57.0 ($\text{HO-N-CH}_2\text{CH}_2$); 46.5 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 27.2 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 20.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 542 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); 564 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); 1105 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$).
HR-MS	berechnet für ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2\text{Na}$): m/z = 564.229033
(EI ⁺ , RT)	gefunden: 564.227160
Smp.	96 °C

4-Amino-N-[2-[2-[(4-aminophenyl)sulfonyl-benzyl-amino]ethyl-hydroxy-amino]ethyl]-N-benzyl-benzensulfonamid (30b)



Der AAV4 folgend ergab die Reaktion von 220 mg (0.38 mmol) **23a** mit 373 mg (1.15 mmol) Cs_2CO_3 und 107 μl (0.92 mmol) Benzylbromid das zweifach alkylierte Produkt **29b** als gelbliches Öl (220 mg, 0.29 mmol, 76 %) nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 4:1). Im direkten Anschluss wurde die alkylierte Verbindung **29b** in einer 1:1 Mischung aus EtOAc und Methanol (*HPLC-grade*) gelöst und für 12 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre mit Palladium als Katalysator hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 5 ml trockenem Ethanol gelöst und zusammen mit 72 mg (0.29 mmol, 1 eq) PPTS für 12 h bei 70 °C zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt **30b** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Gradient: 0 % bis 50 % EtOAc in DCM) als leicht beiger Feststoff (40 mg, 0.07 mmol, 18 % über drei Stufen) isoliert werden.

Ausbeute

40 mg (0.07 mmol, 18 % über drei Stufen)

leicht beiger Feststoff

$^1\text{H-NMR}$

(400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 7.63 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 7.29-7.20 (m, 10H, $-\text{CH}_{\text{benzyl}}$); 6.67 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 5.54 (sbr, 1H, -OH); 4.32 (sbr, 4H, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 4.10 (sbr, 4H, $-\text{NH}_2$); 3.23 (t, 4H, $^3J = 6.4$ Hz, $\text{HO-N-CH}_2\text{CH}_2$); 2.37 (t, 4H, $^3J = 6.2$ Hz, HO-N-CH_2).

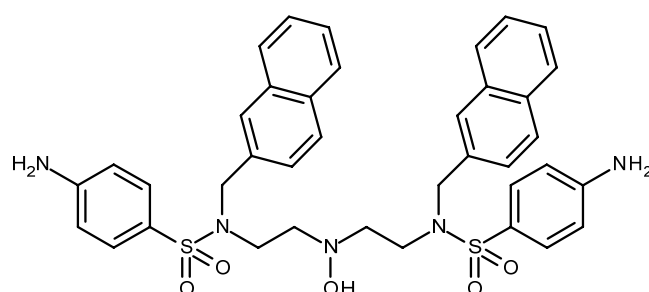
$^{13}\text{C-NMR APT}$

(100.53 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 150.4 ($\text{C}_{\text{q/Ar}}$, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 136.6 ($\text{C}_{\text{q/Ar}}$, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 129.3 (CH_{Ar} , $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 128.5 (CH_{Ar} , $-\text{CH}_2\text{CCHCH}$); 128.4 (CH_{Ar} , $-\text{CH}_2\text{CCH}$); 128.2 ($\text{C}_{\text{q/Ar}}$, $-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 127.7 (CH_{Ar} , $-\text{CH}_2\text{CCHCHCH}$); 114.1 (CH_{Ar} , $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 58.4 (HO-N-CH_2); 52.4 ($\text{HO-N-CH}_2\text{CH}_2$); 45.1 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$).

MS (ES+, RT)	$m/z = 610 ([M+H]^+); 632 ([M+Na]^+)$.
HR-MS	berechnet für (C ₃₀ H ₃₅ N ₅ O ₅ S ₂ Na): $m/z = 632.197733$
(ES+, RT)	gefunden: 632.195677
EA	berechnet *C ₂ H ₄ * ³ / ₄ H ₂ O: C: 59.01 % H: 6.27 % N: 10.68 %
93 % Reinheit	gefunden: C: 58.93 % H: 6.21 % N: 10.35 %
Smp.	81 °C

4-Amino-N-[2-[2-[(4-aminophenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]ethyl-hydroxy-amino]ethyl]-N-(2-naphthylmethyl)benzensulfonamid (30c)

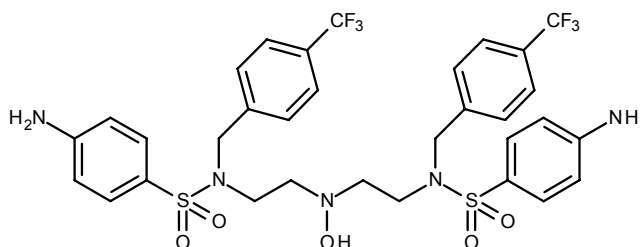


Der **AAV4** folgend ergab die Reaktion von 160 mg (0.28 mmol) **23a** mit 272 mg (0.84 mmol) Cs₂CO₃ und 149 mg (0.67 mmol) 2-(Brommethyl)naphthalen das zweifach alkylierte Produkt **29c** als gelbliches Öl (120 mg, 0.14 mmol, 50 %) nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 4:1). Im direkten Anschluss wurde die alkylierte Verbindung **29c** in einer 1:1 Mischung aus EtOAc und Methanol (*HPLC-grade*) gelöst und für 12 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre mit Palladium als Katalysator hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 5 ml trockenem Ethanol gelöst und zusammen mit 30 mg (0.12 mmol, 1 eq) PPTS für 12 h bei 70 °C zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt **30c** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Gradient: 0 % bis 50 % EtOAc in DCM) als farbloser Feststoff (20 mg, 0.03 mmol, 10 % über drei Stufen) isoliert werden.

Ausbeute	20 mg (0.03 mmol, 10 % über drei Stufen)
	farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.79-7.69 (m, 6H, 6 x -CH _{Naphthyl}); 7.66 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH ₂); 7.54 (sbr, 2H, 2 x -CH _{Naphthyl}); 7.45-7.41 (m, 4H, 4 x -CH _{Naphthyl}); 7.34 (dd, 2H, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 2 x -CH _{Naphthyl}); 6.66 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCH ₂); 5.60 (sbr, 1H, -OH); 4.50 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 4.09 (sbr, 4H, -NH ₂); 3.26 (t, 4H, $^3J = 6.0$ Hz, HO-N-CH ₂ CH ₂); 2.35 (t, 4H, $^3J = 6.0$ Hz, HO-N-CH ₂).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 150.5 (C _{q/Ar} , -SO ₂ CCHCH ₂); 134.1 (C _{q/Ar} , -CH ₂ C _{Ar}); 133.1 (C _{q/Ar} , -CH ₂ CCH ₂); 132.8 (C _{q/Ar} , -CH ₂ CCHCH ₂); 129.4 (CH _{Ar} , -SO ₂ CCH ₂); 128.4 (CH _{Naphthyl}); 128.3 (C _{q/Ar} , -SO ₂ C _{Ar}); 127.8, 127.7, 127.1, 126.24, 126.18, 126.0 (6 x CH _{Naphthyl}); 114.1 (CH _{Ar} , -SO ₂ CCHCH ₂); 58.4 (HO-N-CH ₂); 52.4 (HO-N-CH ₂ CH ₂); 45.0 (-CH ₂ C _{Ar}).
MS (ES⁺, RT)	$m/z = 710$ ([$M+H$] ⁺).
HR-MS	berechnet für (C ₃₈ H ₄₀ N ₅ O ₅ S ₂): $m/z = 710.247088$
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 710.245404
EA	berechnet *C ₃ H ₆ *2¼H ₂ O: C: 62.14 % H: 6.30 % N: 8.84 %
92 % Reinheit	gefunden: C: 62.16 % H: 5.95 % N: 8.44 %
Smp.	102 °C

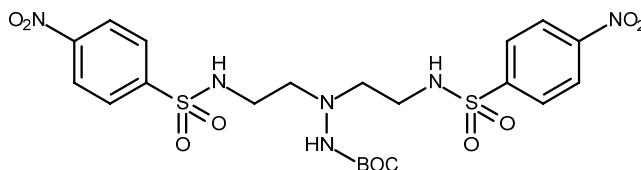
4-Amino-N-[2-[2-[(4-aminophenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]ethyl-hydroxy-amino]ethyl]-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]benzensulfonamid (30d)



Die Verwendung der **AAV4** ergab die Reaktion von 220 mg (0.38 mmol) **23a** mit 370 mg (1.14 mmol) Cs₂CO₃ und 172 mg (1.0 mmol) 4-(Trifluormethyl)benzylbromid das zweifach alkylierte Produkt als farbloses Öl (232 mg, 0.26 mmol, 68 %) nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 3:1). Im direkten Anschluss wurde

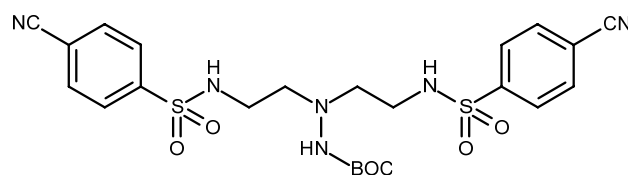
die alkylierte Verbindung **29d** in einer 1:1 Mischung aus EtOAc und Methanol (*HPLC-grade*) gelöst und für 12 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre mit Palladium als Katalysator hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 5 ml trockenem Ethanol gelöst und zusammen mit 63 mg (0.26 mmol, 1 eq) PPTS für 12 h bei 70 °C zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt **30d** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Gradient: 0 % bis 50 % EtOAc in DCM) als farbloser Feststoff (25 mg, 0.03 mmol, 9 % über drei Stufen) isoliert werden.

Ausbeute	25 mg (0.03 mmol, 9 % über drei Stufen) leicht beiger Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.61 (d, 4H, 3J , 5J = 8.7 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.53 (d, 4H, 3J , 5J = 8.0 Hz, -CH ₂ C _{Ar} CH); 7.33 (d, 4H, 3J , 5J = 8.0 Hz, -CH ₂ C _{Ar} CHCH); 6.67 (d, 4H, 3J , 5J = 8.7 Hz, -SO ₂ CCH); 5.83 (sbr, 1H, -OH); 4.44 (s, 4H, -CH ₂ CH _{Ar}); 4.14 (sbr, 4H, -NH ₂); 3.29 (t, 4H, 3J = 5.7 Hz, HO-N-CH ₂ CH ₂); 2.47 (t, 4H, 3J = 6.0 Hz, HO-N-CH ₂).
¹³C-NMR (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 150.6 (-SO ₂ CCHCH); 141.1 (-CH ₂ C _{Ar}); 129.3 (-SO ₂ CCH); 128.3 (-SO ₂ C _{Ar}); 128.2 (-C _{Ar} CF ₃ , 2J = 40.0 Hz); 125.5 (-CHCCF ₃ , 3J = 3.9 Hz); 125.4 (-NCH ₂ CCH); 124.0 (-CF ₃ , 1J = 266 Hz); 114.1 (-SO ₂ CCHCH); 58.5 (HO-N-CH ₂); 51.2 (HO-N-CH ₂ CH ₂); 45.4 (-CH ₂ C _{Ar}).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 746 ([<i>M</i> +H] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₃₂ H ₃₄ N ₅ O ₅ F ₆ S ₂): m/z = 746.190558
(EI ⁺ , RT)	gefunden: 746.188852
Smp.	96 °C

***Tert*-butyl N-[bis[2-[(4-nitrophenyl)sulfonylamino]ethyl]amino]carbamate (**32a**)**

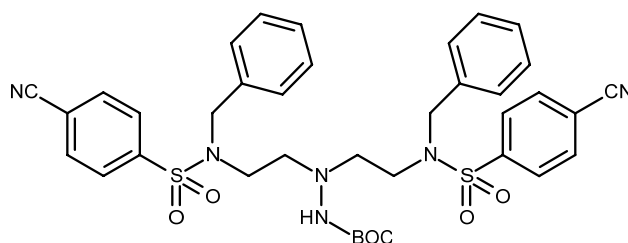
417 mg *tert*-Butylcarbazat (3.16 mmol, 1 eq) und 1.8 g Aziridin **22a** (7.89 mmol, 2.5 eq) wurden in 15 ml Chloroform gelöst und anschließend für 4 Tage unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mittels MPLC (EtOAc in *cyclo*-Hexan 22% bis 50% + 0.1 % NH₃/MeOH) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **32a** wurde in Form eines farblosen, klebrigen Feststoffs (1.61 g, 2.74 mmol, 87 %) erhalten.

Ausbeute	1.61 g (2.74 mmol, 87 %) farbloser, klebriger Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.39 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.7 Hz, -SO ₂ CCHCH); 8.03 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.9 Hz, -SO ₂ CCH); 7.88 (sbr, 1H, -NHBoc); 7.62 (sbr, 2H, -NH <u>SO</u> ₂); 2.80 (sbr, 4H, -NNCH ₂ CH ₂); 2.63 (t, 4H, ³ J = 6.5 Hz, -NNCH ₂); 1.22 (sbr, 9H, -C(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 155.5 (C _q , -C <u>OO</u> (CH ₃) ₃); 149.5 (C _q , -C <u>Ar</u> NO ₂); 145.8 (-SO ₂ C <u>Ar</u>); 128.0 (-SO ₂ C <u>CH</u>); 124.5 (-SO ₂ CCH <u>CH</u>); 78.7 (C _q , -C(CH ₃) ₃); 55.8 (-NNCH ₂ CH ₂); 40.2 (-NNCH ₂ CH ₂); 27.8 (-C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	<i>m/z</i> = 606 (100, [M+NH ₄] ⁺); 611 (58, [M+Na] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₁₀ S ₂ Na): <i>m/z</i> = 611.120605 gefunden: 611.117607
EA	berechnet für *H ₂ O: C: 41.58 % H: 4.98 % N: 13.85 % gefunden: C: 41.83 % H: 5.23 % N: 13.55 %
Smp.	95.6 °C

***Tert*-butyl N-[bis[2-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]ethyl]amino]carbamate (**32b**)**

127 mg *tert*-Butylcarbazat (0.96 mmol, 1 eq) und 500 mg Aziridin **22b** (2.40 mmol, 2.5 eq) wurden in 10 ml Chloroform gelöst und anschließend für 4 Tage unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt und der Rückstand mittels MPLC (EtOAc in *cyclo*-Hexan 22% bis 50% + 0.1 % NH₃/MeOH) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **32b** wurde in Form eines farblosen Harzes (211 mg, 0.38 mmol, 40 %) erhalten.

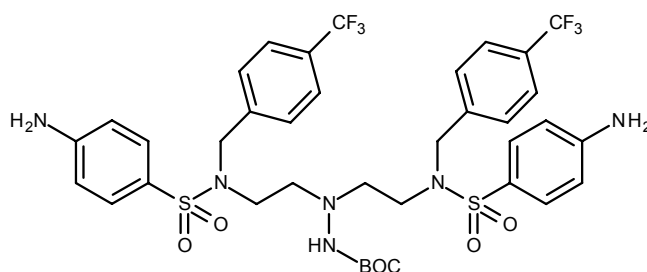
Ausbeute	211 mg (0.38 mmol, 40 %) farbloser Harz
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 8.04 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.3$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.83 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.0$ Hz, -SO ₂ CCH); 6.07 (ms, 2H, -NH ₂ SO ₂); 5.17 (sbr, 1H, -NHBoc); 3.18-2.84 (sbr, 4H, -NCH ₂ CH ₂); 2.72-2.65 (sbr, 4H, -NCH ₂); 1.30 (sbr, 9H, -C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 549 (7, [M+H] ⁺); 566 (100, [M+NH ₄] ⁺); 571 (58, [M+Na] ⁺); 1114 (12, [2M+NH ₄] ⁺).

***Tert*-butyl N-[bis[2-[benzyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]ethyl]amino]carbamate (**33a**)**

Die Verwendung der **AAV4** ergab nach Reaktion von 200 mg (0.37 mmol) **32b** mit 356 mg (1.09 mmol) Cs₂CO₃ und 150 mg (0.87 mmol) Benzylbromid das zweifach alkylierte Produkt als farblosen Feststoff (110 mg, 0.15 mmol, 41 %) nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 3:1).

Ausbeute	110 mg (0.15 mmol, 41 %)
	farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.88 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.6$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.77 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.6$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.29-7.25 (m, 6H, 6 x -CH _{benzyl}); 7.16-7.13 (m, 4H, 4 x -CH _{benzyl}); 5.40 (sbr, 1H, -NHBoc); 4.32 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.15 (t, 4H, -NHNCH ₂); 2.63 (sbr, 4H, -NHNCH ₂ CH ₂); 1.37 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 143.8 (C _q , -SO ₂ C _{Ar}); 135.3 (C _q , -CH ₂ C _{Ar}); 132.9 (-SO ₂ CCH); 128.6 (-SO ₂ CCHCH); 128.2, 128.1, 127.6 (-CH _{benzyl}); 117.2 (C _q , -C _{Ar} CN); 116.1 (C _q , -CN); 76.9 (C _q , -C(CH ₃) ₃); 55.7 (-NHNCH ₂ CH ₂); 52.7 (-CH ₂ C _{Ar}); 45.7 (-NHNCH ₂ CH ₂); 28.2 (-C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 751$ ([M+Na] ⁺)
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₃₇ H ₄₀ N ₆ O ₆ S ₂ Na): $m/z = 751.234847$ gefunden: 751.233470
EA	berechnet für *1½H ₂ O: C: 58.79 % H: 5.73 % N: 11.12 % gefunden: C: 59.12 % H: 5.49 % N: 10.84 %
Smp.	203 °C

***Tert*-butyl N-[bis[2-[(4-aminophenyl)sulfonyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]amino]ethyl]amino]carbamat (**34b**)**

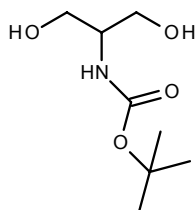


Die Verwendung der **AAV4** ergab nach Reaktion von 200 mg (0.34 mmol) **32a** mit 119 mg (1.02 mmol) Cs₂CO₃ und 195 mg (0.82 mmol) 4-(Trifluormethyl)benzylbromid das zweifach alkylierte Produkt als leicht gelben Feststoff (210 mg, 0.23 mmol, 68 %) nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 3:1). Im direkten Anschluss wurde die alkylierte Verbindung **33b** in einer 1:1 Mischung aus EtOAc und Methanol

(HPLC-grade) gelöst und für 12 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre mit Palladium als Katalysator hydriert. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 110 mg (0.13 mmol, 38 % über zwei Stufen) der Verbindung **34b** konnten als leicht gelbes Öl isoliert werden.

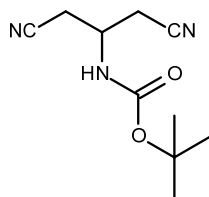
Ausbeute	110 mg (0.13 mmol, 38 % über zwei Stufen) leicht gelbes Öl
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.56 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.8$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.52 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.3$ Hz, -CH ₂ C _{Ar} CHCH); 7.34 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.0$ Hz, -CH ₂ C _{Ar} CH); 6.66 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.8$ Hz, -SO ₂ CCH); 5.37 (sbr, 1H, -NHBoc); 4.33 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 4.12 (s, 4H, -NH ₂); 3.09 (t, 4H, $^3J = 6.7$ Hz, -NHNCH ₂)*; 2.63 (sbr, 4H, -NHNCH ₂ CH ₂)*; 1.32 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).

Tert-butyl N-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]carbamate (35b**)**



Die Einführung der Boc-Schutzgruppe am Stickstoffatom des Serinols erfolgte analog zu einer publizierten Vorschrift von Neri et al. aus 2003. [101]

Ausbeute	90 % farblose Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 5.32 (d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, -NHCO ₂ C(CH ₃) ₃); 3.83-3.70 (m, 4H, -CH ₂ OH); 3.66 (mbr, 1H, -NHCHCH ₂); 3.14 (mbr, 2H, -OH); 1.44 (sbr, 9H, -CO ₂ C(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 156.4 (-CO ₂ (CH ₃) ₃); 79.9 (-C(CH ₃) ₃); 62.9 (-CH ₂ OH); 53.1 (-CHCH ₂); 28.3 (-C(CH ₃) ₃).
Smp.	99.5-101 °C

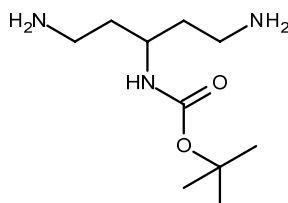
***Tert*-butyl N-[2-cyano-1-(cyanomethyl)ethyl]carbamate (**36**)**

In Anlehnung an eine Literaturvorschrift wurde aus dem Diol **35b** das entsprechende Dinitril **36** hergestellt. Im ersten Schritt wurden unter Argon 1.3 g (6.80 mmol, 1eq) Diol **35b** in 30 ml DCM gelöst und im Eisbad auf 0 °C runtergekühlt. Nach Zugabe von 2.82 ml (20.39 mmol, 3 eq) Triethylamin zum Reaktionsansatz, wurde für 10 min gerührt und anschließend 1.26 ml (16.32 mmol, 2.4 eq) Methansulfonylchlorid langsam zugetropft. Nach 3 h im Eisbad wurde dieses entfernt und für weitere 2 h bei RT die Reaktion vervollständigt. Die Dichlormethan-Phase wurde mit 1N HCl, H₂O, ges. NaHCO₃- sowie mit ges. NaCl-Lösung (jeweils 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über MgSO₄ getrocknet, filtriert und durch Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Der ölige Rückstand wurde über eine FC aufgereinigt und das isolierte Mesylat (1.6 g, 4.61 mmol, 1 eq) direkt weiter umgesetzt. Dazu wurde das Dimesylat unter Argon in 30 ml trockenem DMF gelöst und mit 1.13 g (23.02 mmol, 5 eq) Natriumcyanid zur Reaktion gebracht. Nach 72 h bei 70 °C wurde der Reaktionsansatz mit 30 ml EtOAc verdünnt und die organische Phase mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotavapor das Lösungsmittel entfernt. Der ölig braune Rückstand wurde mittel FC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 2:1) aufgereinigt und das gewünschte Produkt **36** in Form eines farblosen, kristallinen Feststoffs (824 mg, 3.94 mmol) in einer Ausbeute von 60 % über 2 Stufen erhalten.

Ausbeute	824 mg (3.94 mmol, 60 % über 2 Stufen) farbloser kristalliner Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 5.05 (d, 1H, ³ J = 7.8 Hz, -NH); 4.20 (ms, 1H, -NHCH); 2.81-2.72 (m, 4H, -CH ₂ CN); 1.45 (sbr, 9H, -C(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 154.6 (-CO ₂ (CH ₃) ₃); 116.1 (-CN); 81.4 (-C(CH ₃) ₃); 44.8 (-CH); 28.7 (-C(CH ₃) ₃); 22.7 (-CH ₂ CN).

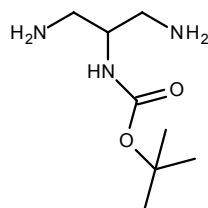
MS (ES+, RT)	$m/z = 227.16$ (100 $[M+NH_4]^+$); 232.17 (21 $[M+Na]^+$); 436.3 (10 $[2M+NH_4]^+$); 441.27 (11 $[2M+Na]^+$).		
HR-MS	berechnet für (C ₁₀ H ₁₉ N ₄ O ₂): $m/z =$	227.150801	
(ES+, RT)	gefunden:	227.146164	
EA	berechnet für:	C: 57.40 %	H: 7.23 % N: 20.08 %
	gefunden:	C: 57.66 %	H: 7.44 % N: 20.10 %
Smp.	105 °C		

***Tert*-butyl N-[3-amino-1-(2-aminoethyl)propyl]carbamate (**38**)**



In einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol mit 10 % Chloroform (10 ml) wurden 500 mg (2.39 mmol) des Dinitrils **36** gelöst und mit 50 mg Platinoxid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend in einem Druckgefäß bei 4.5 bar und 75 °C für 10 h hydriert. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand in Form eines weißen Feststoffs wurde ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Ausbeute	824 mg (3.94 mmol, 60 % über 2 Stufen)		
	farbloser kristalliner Feststoff		
MS (ES+, RT)	$m/z = 457$ ($[2M+Na]^+$).		
HR-MS	berechnet für (C ₂₀ H ₄₆ N ₆ O ₄ Na): $m/z =$	457.347824	
(ES, RT)	gefunden:	457.349031	

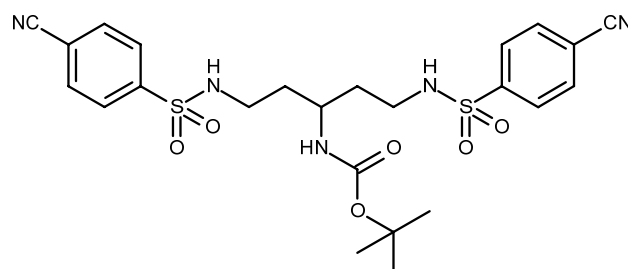
***Tert*-butyl N-[2-amino-1-(aminomethyl)ethyl]carbamate (**39**)**

In einem Dreihalskolben unter Argon mit Trockenrohr und Thermometer wurden 22.04 g (87.86 mmol, 5.6 eq) Triphenylphosphin vorgelegt, in 120 ml trockenem THF gelöst und in einem Eis-Salzbad auf -15 °C gekühlt. Bei der tropfenweisen Zugabe von 6.92 ml (43.93 mmol, 2.8 eq) Diethylazodicarboxylat durfte die Temperatur nicht über -10 °C steigen. Nach 30 min wurden 3.00 g (15.69 mmol, 1 eq) des 1,3-Diols **35b** in einer Portion zugegeben. Weitere 30 min später wurden 10.16 ml (47.07 mmol, 3 eq) DPPA langsam zugetropft, ohne die Temperatur ansteigen zu lassen. Innerhalb der nächsten 10 h ließ man den Reaktionsansatz im Eis-Salzbad langsam auf RT aufwärmen. Nach weiteren 5 h bei RT und falls der Reaktionsfortschritt abgeschlossen war, wurden 55 ml 25 %ige NH_3/aq -Lösung zugegeben und über Nacht hydrolysiert. Anschließend wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt, der klebrige Rückstand vorsichtig auf Kieselgel aufgezogen und über MPLC (Aminphase, 10 % MeOH in DCM +0.1 % NH_3/MeOH) aufgereinigt. Das Bisamin **39** wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 61 % erhalten.

Ausbeute	1.8 g (9.5 mmol, 61 %)
	gelbes Öl
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_4\text{-CD}_3\text{OD}$)	δ [ppm] = 3.48 (ms, 1H, -NHCH); 2.72 (dd, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, $^2J = 13.2$ Hz, -NHCHCH ₂); 2.58 (dd, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, $^2J = 13.2$ Hz, -NHCHCH ₂); 1.45 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).
$^{13}\text{C-NMR APT}$ (100.53 MHz, $\text{D}_4\text{-CD}_3\text{OD}$)	δ [ppm] = 158.6 (-C=O) 80.2 (-C(CH ₃) ₃); 56.7 (-NHCH); 44.2 (NH ₂ CH ₂); 28.7 (-C(CH ₃) ₃).
MS (ES+, RT)	m/z = 190.2 ($[M+H]^+$); 379.3 ($[2M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für ($\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$): m/z = 190.155552
(ES+, RT)	gefunden: 190.161322

EA	berechnet für *½H ₂ O: C: 48.46 % H: 10.17 % N: 21.19 %
	gefunden: C: 48.28 % H: 10.14 % N: 20.85 %

***Tert*-butyl N-[3-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]-1-[2-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]-ethyl]propyl]carbamat (**41**)**

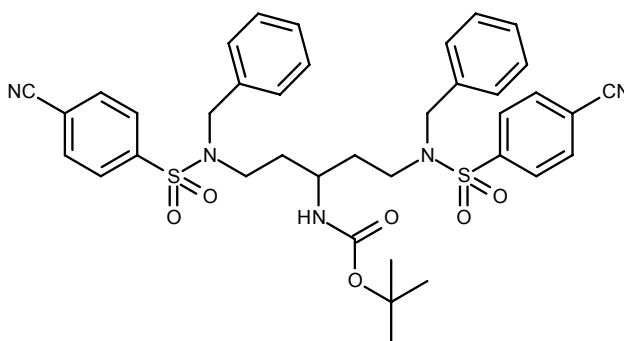


In 5 ml trockenem DCM, 1.5 ml trockenem Methanol und unter Argon wurden 320 mg (1.10 mmol, 1 eq) Diamin **38** vorgelegt und im Eis-Salzbad auf -5 °C gekühlt. Nach Zugabe von 385 µl (2.20 mmol, 2 eq) DIPEA wurde 10min gerührt und anschließend 423 mg (2.08 mmol, 1.9 eq) 4-Cyanobenzylsulfonylchlorid portionsweise zum Ansatz hinzugefügt. Die Reaktion wurde für die nächsten 5 h bei 0 °C gerührt und nach vollständiger Umsetzung mit 15 ml H₂O verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit 3x20 ml EtOAc extrahiert und anschließend die vereinigten organischen Phasen gegen ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotavapor unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Das Produkt **41** wurde in Form farbloser Kristalle (416 mg, 0.76 mmol, 75 %) nach Aufreinigung über MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 2:1) erhalten.

Ausbeute	416 mg (0.76 mmol, 75 %)
	farblose Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.96 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.7 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.80 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.7 Hz, -SO ₂ CCH); 5.66 (tps, ³ J = 6.3 Hz, 2H, -NH <u>S</u> O ₂); 4.30 (d, 1H, ³ J = 9.4 Hz, -NH <u>C</u> OOC(CH ₃) ₃); 3.65 (ms, 1H, -CH <u>C</u> H ₂); 3.12 (m, 2H, -CH ₂ <u>N</u> H); 2.88 (ms, 2H, -CH ₂ <u>N</u> H); 1.69 (ms, 2H, -CHCH ₂); 1.50-1.41 (m, 2H, -CHCH ₂); 1.33 (d, 9H, -C(CH ₃) ₃).

^{13}C-NMR (100.53 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 156.9 ($-\text{CO}_2(\text{CH}_3)_3$); 144.3 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 133.0 ($-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 127.6 ($-\text{SO}_2\text{CCH}$); 117.3 ($-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CN}$); 116.3 ($-\text{CN}$); 80.6 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 44.9 ($-\text{NHCH}$); 39.9 ($-\text{NHCHCH}_2\text{CH}_2$); 35.9 ($-\text{NHCHCH}_2$); 28.2 ($-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 565 ($[M+\text{NH}_4]^+$); 570 ($[M+\text{Na}]^+$)
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für $(\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2\text{Na})$: m/z = 570.145697 gefunden: 570.146864
EA	berechnet für: C: 52.64 % H: 5.34 % N: 12.79 % gefunden: C: 52.47 % H: 5.74 % N: 12.61 %
Smp.	138.5-140 °C

***Tert*-butyl-*N*-[3-[benzyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]-1-[2-[benzyl-(4-cyanophenyl)-sulfonyl-amino]ethyl]propyl]carbamate (42a)**

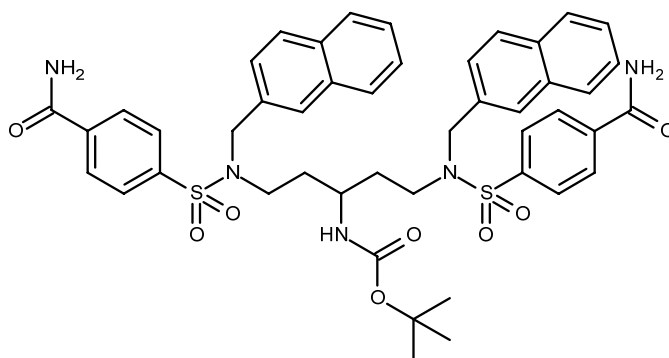


In 30 ml trockenem Acetonitril wurden 300 mg (0.55 mmol, 1 eq) **41** gelöst und mit 228 mg (1.65 mmol, 3 eq) wasserfreiem K_2CO_3 , 145 μl (1.22 mmol, 2.2 eq) Benzylbromid sowie katalytischen Mengen KI bei 85 °C zur Reaktion gebracht. Nach 3 h wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Mittels MPLC (30 % EtOAc in *iso*-Hexan) wurde der Rückstand aufgereinigt und das Produkt in Form eines farblosen Feststoffs (251 mg, 0.34 mmol, 62 %) isoliert.

Ausbeute	251 mg (0.34 mmol, 62 %)
	farbloser Feststoff

¹H-NMR	δ [ppm] = 7.96 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.77
Rotamere (400 MHz, CDCl ₃)	(d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.31-7.22 (m, 6H, CH _{benzyl}); 7.18-7.12 (m, 4H, CH _{benzyl}); 4.32 (ms, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 4.03 (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, -NHCOOC(CH ₃) ₃); 3.16-2.97 (ms, 5H, -CHCH ₂ , -CH ₂ NH); 1.38 (d, 9H, -C(CH ₃) ₃); 1.36-1.30 (m, 4H, -CHCH ₂).
¹³C-NMR	δ [ppm] = 155.1 (-CO ₂ (CH ₃) ₃); 143.8 (-SO ₂ C _{Ar}); 135.3
Rotamere (100.53 MHz, CDCl ₃)	(-CH ₂ C _{Ar}); 132.9 (-SO ₂ CCHCH); 128.8, 128.4, 128.3 (3 x CH _{Ar}); 127.7 (-SO ₂ CCH); 117.3 (-C _{Ar} CN); 116.3 (-CN); 52.5 (-NCH ₂ C _{Ar}); 46.4 (-NHCH); 45.5 (-NHCHCH ₂ CH ₂); 34.5 (-NHCHCH ₂); 28.3 (-CO ₂ C(CH ₃) ₃).
MS (ES+, RT)	m/z = 745 ([M+NH ₄) ⁺]; 750 ([M+Na] ⁺)
HR-MS (ES+, RT)	berechnet für (C ₃₈ H ₄₁ N ₅ O ₆ S ₂ Na): m/z = 750.239598 gefunden: 750.241204
EA	berechnet: C: 62.70 % H: 5.68 % N: 9.62 % gefunden: C: 62.72 % H: 6.08 % N: 9.24 %
Smp.	129.5-131 °C

***Tert*-butyl N-[3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]-1-[2-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]ethyl]propyl]carbamate (42b)**

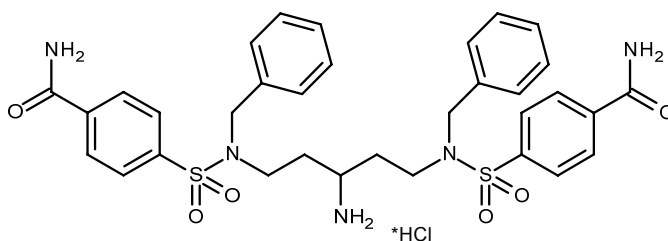


In Anlehnung an die **AAV4** wurden 140 mg (0.26 mmol, 1 eq) **41** mit 91 mg (0.78 mmol, 3 eq) Cs₂CO₃ und 138 mg (0.62 mmol, 2.4 eq) 2-Naphthylbromid bei RT zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (Gradient: 16 % bis 30 % EtOAc in *iso*-Hexan) aufgereinigt und das Produkt in Form eines farblosen Feststoffs

(152 mg, 0.18 mmol, 71 %) isoliert. Anschließend wurden der **AAV6** folgend 148 mg (0.18 mmol) der Boc-geschützten Verbindung mit 1.8 ml 30%iger H₂O₂-Lösung und 124 mg K₂CO₃ zur Reaktion gebracht und das ausgefällte Carboxamid abfiltriert und mit H₂O gewaschen. Das gewünschte Produkt konnte als farbloser Feststoff und in einer Ausbeute von 65 % über 2 Stufen (151 mg, 0.17 mmol) erhalten werden.

Ausbeute	151 mg (0.17 mmol, 65 % über 2 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.20 (sbr, 2H, -CONH ₂); 8.05 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.2 Hz, -SO ₂ CCH); 7.88 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.86-7.73 (m, 6H, 6 x CH _{Naphthyl}); 7.63 (sbr, 4H, 2 x -CH _{Naphthyl} , -CONH ₂); 7.48 (ms, 4H, 4 x CH _{Naphthyl}); 7.33 (ms, 2H, 2 x -CH _{Naphthyl}); 6.50 (d, ³ J = 8.9 Hz, -NH); 4.41 (d, 2H, ² J = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.31 (d, 2H, ² J = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.06 (ms, 1H, -NHCH); 2.93 (ms, 4H, -CH ₂ CH ₂ N); 1.28-1.12 (m, 13H, -CHCH ₂ , -COOC(CH ₃) ₃).

4-[[3-Amino-5-[benzyl-(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-amino]pentyl]-benzyl-sulfamoyl] benzamid-Hydrochlorid (43a)

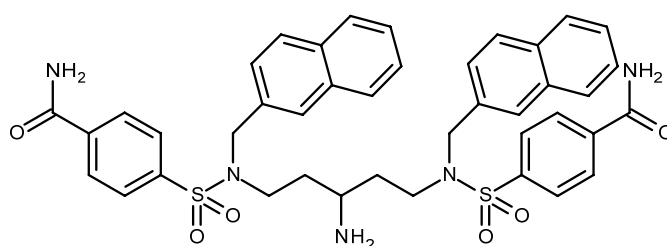


In Anlehnung an **AAV6** wurden 165 mg (0.260 mmol) der Boc-geschützten Verbindung **42a** mit 2.5 ml 30%iger H₂O₂-Lösung und 189 mg K₂CO₃ zur Reaktion gebracht und das ausgefällte Carboxamid abfiltriert. Diese Zwischenstufe wurde im nächsten Schritt der **AAV2** folgend mit 5 ml 4M HCl in Dioxan entschützt, mit Ether gewaschen und abgesaugt. Das gewünschte Produkt wurde als ein leicht beiges Pulver (80 mg, 0.114 mmol) in einer Ausbeute von 44 % über 2 Stufen erhalten.

Ausbeute	80 mg (0.114 mmol, 44 % über 2 Stufen) leicht beiges Pulver
-----------------	--

¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.29 (sbr, 2H, CONH ₂); 8.09 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.5 Hz, -SO ₂ CCH); 7.93 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.88-7.72 (sbr, 3H, -NH ₃ ⁺); 7.64 (sbr, 2H, -CONH ₂); 7.32-7.19 (m, 10H, 10 x CH _{Ar}); 4.29 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.17-2.94 (m, 4H, -CH ₂ N); 2.96 (ms, 1H, NH ₃ ⁺ CH); 1.52-1.20 (ms, 4H, -CHCH ₂).
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 166.5 (-CONH ₂); 141.2 (-SO ₂ C _{Ar}); 138.1 (-C _{Ar} CONH ₂); 136.7 (-NCH ₂ C _{Ar}); 128.5, 128.4, 127.9, 127.6, 126.9 (5 x -CH _{Ar}); 51.7 (-NCH ₂ C _{Ar}); 46.2 (-NH ₃ ⁺ CH); 44.8 (-NCH ₂ CH ₂); 31.0 (-NCH ₂ CH ₂).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 664 ([M+H] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₃₃ H ₃₈ N ₅ O ₆ S ₂): m/z = 664.226353 gefunden: 664.230148
EA	berechnet für *3H ₂ O: C: 52.54 % H: 5.88 % N: 9.28 % gefunden: C: 52.87 % H: 5.61 % N: 9.55 %
Smp.	164 °C

4-[[3-Amino-5-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]pentyl]-(2-naphthylmethyl)sulfamoyl]benzamid (43b)

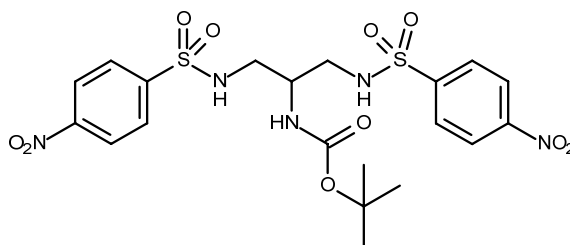


Der AAV2 folgend wurde Verbindung **42b** (146 mg, 0.17 mmol) mit 5 ml 4M HCl in Et₂O entschützt, mit Ether gewaschen und abgesaugt. Das gewünschte Produkt wurde mittels MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) aufgereinigt und anschließend als ein farbloses Pulver (30 mg, 0.04 mmol) in einer Ausbeute von 23 % erhalten.

Ausbeute	30 mg (0.04 mmol, 23 %)
	farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$) Wasserstoffbrücke $\text{NH}_2\text{---NH}_2\text{CO}$	δ [ppm] = 9.45 (tps, 1H, $^3J = 4.8$ Hz, $-\text{NH}_2\text{---NH}_2\text{CO}$); 8.25 (sbr, 1H, $-\text{CONH}_2\text{---NH}_2$)*; 8.17-8.09 (m, 4H, 4 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 7.99-7.94 (m, 3H, 3 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 7.83-7.71 (m, 5H, 5 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 7.65 (sbr, 1H, $-\text{CONH}_2\text{---NH}_2$)*; 7.60 (sbr, 2H, $-\text{CONH}_2\text{---NH}_2$)*; 7.46 (ms, 4H, 4 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 7.34-7.21 (mbr, 7H, 6 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 4.94 (tps, 1H, $^3J = 4.6$ Hz, $-\text{NH}_2\text{---NH}_2\text{CO}$); 4.35 (d, 2H, $^2J = 14.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 4.26 (d, 2H, $^2J = 15.3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 3.19-3.08 (mbr, 2H, $\text{NH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2$); 2.99-2.89 (sbr, 2H, $\text{NH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2$); 2.83-2.76 (sbr, 1H, NH_2CH); 1.47-1.36 (sbr, 2H, NH_2CHCH_2); 1.30-1.19 (sbr, 2H, NH_2CHCH_2).
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.53 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$) Wasserstoffbrücke $\text{NH}_2\text{---NH}_2\text{CO}$	δ [ppm] = 166.5, 165.3 ($-\text{CONH}_2$); 141.3, 141.2 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 138.1($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$)*; 137.6 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHC}$)*; 134.2, 134.1 ($-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}_2$)*; 132.6, 132.3 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHCH}$)*; 128.6 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHCHC}$)*; 128.1 ($-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$)*; 127.54, 127.52 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}$)*; 127.0, 126.97, 126.7, 126.3, 126.1, 125.9 (6 x $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 51.8 ($-\text{NCH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 46.1 (NH_2CH); 45.0 ($-\text{NCH}_2\text{CH}_2$); 32.1 ($-\text{CHCH}_2$).
MS (ES+, RT)	$m/z = 764$ ($[M+H]^+$).
HR-MS	berechnet für $(\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2)$: $m/z = 764.257653$
(ES+, RT)	gefunden: 764.252993
Smp.	175 °C

***Tert*-butyl N-[2-[(4-nitrophenyl)sulfonylamino]-1-[[[(4-nitrophenyl)sulfonylamino]methyl]ethyl]carbamate (45a)**

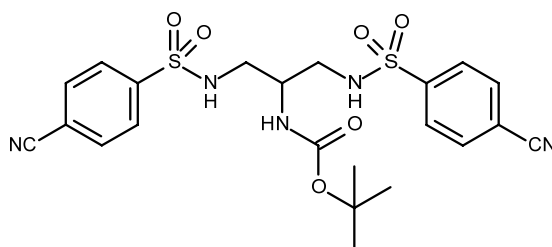


In 40 ml trockenem DCM und unter Argon wurden 770 mg (4.07 mmol, 1 eq) Diamin **39** vorgelegt und im Eis-Salzbad auf -5 °C gekühlt. Als nächstes wurde 1.38 ml (8.14 mmol, 2 eq) DIPEA zugesetzt und nach weiteren 10 min wurde 1.80 g (8.14 mmol, 2 eq) 4-Nitrobenzylsulfonylchlorid portionsweise zum Ansatz hinzugefügt.

Die Reaktion wurde für die nächsten 5 h bei 0 °C gerührt und nach vollständiger Umsetzung mit 60 ml H₂O und 60 ml TBME verdünnt. Die wässrige Phase wurde noch mit 3x30 ml EtOAc extrahiert und anschließend die vereinigten organischen Phasen gegen ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotavapor unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt. Das Produkt **45a** wurde als farbloses Pulver (1.5 g, 2.68 mmol, 66 %) nach Aufreinigung über MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 1:1) erhalten.

Ausbeute	1.5 g (2.68 mmol, 66 %)
	farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.40 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 8.09-7.99 (sbr, 2H, -NH <u>SO</u> ₂); 8.01 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, -SO ₂ CCH); 6.47 (d, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, -NHCOOC(CH ₃) ₃); 3.48 (m, 1H, -NHCH); 2.86 (dd, 2H, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, -CHCH ₂); 2.76 (dd, 2H, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, -CHCH ₂); 1.33 (d, 9H, -C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 574.0$ (65, [M+H] ⁺); 596.1 (100, [M+Na] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₈ H ₂₀ N ₃ O ₂): $m/z = 596.110361$
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 596.109706
Smp.	202-204 °C

***Tert*-butyl N-[2-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]-1-[[[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]methyl]ethyl]carbamate (**45b**)**

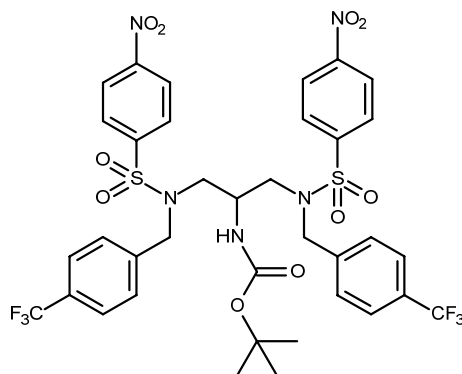


In 40 ml trockenem DCM und unter Argon wurden 770 mg (4.07 mmol, 1 eq) Diamin **39** vorgelegt und im Eis-Salzbad auf -5 °C gekühlt. Als nächstes wurden 1.38 ml (8.14 mmol, 2 eq) DIPEA zugesetzt und nach weiteren 10 min wurden 1.64 g (8.14 mmol, 2 eq) 4-Cyanobenzylsulfonylchlorid portionsweise zum Ansatz

hinzugefügt. Die Reaktion wurde für die nächsten 5 h bei 0 °C gerührt und nach vollständiger Umsetzung mit 60 ml H₂O und 60 ml TBME verdünnt. Die wässrige Phase wurde noch mit 3x30 ml EtOAc extrahiert und anschließend die vereinigten organischen Phasen gegen ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotavapor unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Das Produkt **45b** wurde als farbloses Pulver (1.6 g, 3.08 mmol, 76 %) nach Aufreinigung über MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 1:1) erhalten.

Ausbeute	1.6 g (3.08 mmol, 76 %)
	farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.17 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 8.09-7.99 (sbr, 2H, -NH <u>SO</u> ₂); 7.92 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCH); 6.44 (d, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, -NHCOOC(CH ₃) ₃); 3.46 (m, 1H, -NHCH); 2.81 (dd, 2H, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, -CHCH ₂); 2.73 (dd, 2H, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 7.3$ Hz, -CHCH ₂); 1.34 (s, 9H, C(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR APT	δ [ppm] = 155.5 (-CO ₂ C(CH ₃) ₃); 145.1 (-SO ₂ C _{Ar}); 134.2 (-SO ₂ CCHCH); 127.7 (-SO ₂ CCH); 118.3 (-C _{Ar} CN); 115.4 (-CN); 78.6 (-C(CH ₃) ₃); 50.8 (-NHCHCH ₂); 44.3 (-NHCHCH ₂); 28.7 (-C(CH ₃) ₃).
Rotamere (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 537$ ([M+NH ₄] ⁺); 542 ([M+Na] ⁺).
HR-MS	berechnet für (C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₆ S ₂ Na): $m/z = 542.114397$
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 542.111814
EA	berechnet für * ¹ / ₄ H ₂ O: C: 50.42 % H: 4.90 % N: 13.36 % gefunden: C: 50.28 % H: 5.09 % N: 13.06 %
Smp.	194-196 °C

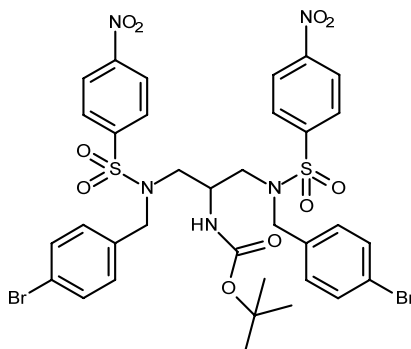
***Tert*-butyl *N*-[2-[(4-nitrophenyl)sulfonyl-[[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino]-1-[[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino]methyl]ethyl] carbamat (**46b**)**



Die Durchführung der **AAV4** mit 180 mg (0.32 mmol) des Sulfonamids **45a**, 170 mg (0.71 mmol) 4-(Trifluormethyl)benzylbromid sowie 314 mg (0.97 mmol) Cs₂CO₃ ergab nach MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 30:1 bis 3:1) das Produkt in Form eines farblosen Pulvers (182 mg, 0.21 mmol, 65 %).

Ausbeute	182 mg (0.21 mmol, 65 %)
	farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.34 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.99 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.59 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz, -CF ₃ CCH)*; 7.33 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.0$ Hz, -CF ₃ CCHCH)*; 6.38 (d, 1H, $^3J = 9.4$ Hz, -NHCO ₂ C(CH ₃) ₃); 4.43 (d, 2H, $^2J = 16.3$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.36 (d, 2H, $^2J = 16.3$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.72 (sbr, 1H, -NH ₂ CH); 3.12 (m, 4H, -NH ₂ CHCH ₂); 1.21 (s, 9H, -COOC(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 876.3 ([M+H] ⁺); 898.2 ([M+Na] ⁺)
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₃₆ H ₃₅ F ₆ N ₅ O ₁₀ S ₂ Na): m/z = 898.162726 gefunden: 898.162254

***Tert*-butyl *N*-[2-[(4-bromphenyl)methyl-(4-nitrophenyl)sulfonyl-amino]-1-[[4-bromphenyl)methyl-(4-nitrophenyl)sulfonyl-amino]methyl]ethyl]carbamate (**46c**)**



Die Umsetzung von 180 mg (0.32 mmol) des Sulfonamids **45a** mit 117 mg (0.71 mmol) 4-Brombenzylbromid und 314 mg (0.97 mmol) Cs_2CO_3 ergab nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 30:1 bis 3:1) das gewünschte Produkt als einen farblosen Feststoff (158 mg, 0.18 mmol, 55 %).

Ausbeute

158 mg (0.18 mmol, 55 %)

farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$

(400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$)

δ [ppm] = 8.35 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 7.99 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 7.44 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, BrCCH); 7.06 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, BrCCHCH); 6.31 (d, 1H, $^3J = 9.4$ Hz, $-\text{NHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 4.29 (d, 2H, $^2J = 15.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 4.23 (d, 2H, $^2J = 16.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 3.71 (sbr, 1H, $-\text{NHCH}$); 3.04 (ms, 4H, $-\text{NHCHCH}_2$); 1.22 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

MS (ES⁺, RT)

$m/z = 919.90$ ($[^{79}\text{Br}^{81}\text{Br } M + \text{Na}]^+$)

HR-MS

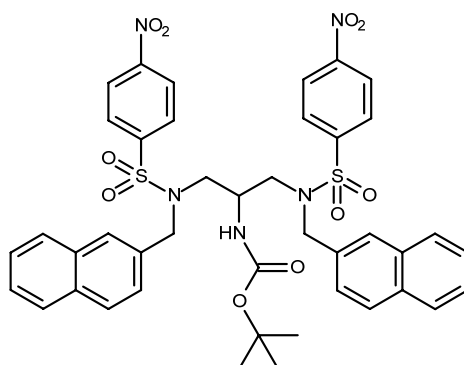
berechnet für $(\text{C}_{34}\text{H}_{35}^{79}\text{Br}^{81}\text{BrN}_5\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Na})$: $m/z = 920.006932$

(ES⁺, RT)

gefunden:

919.998948

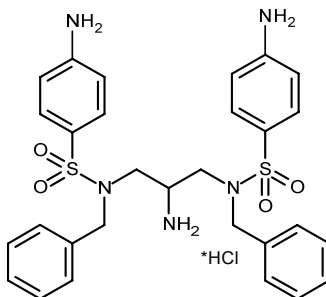
***Tert*-butyl *N*-[2-[2-naphthylmethyl-(4-nitrophenyl)sulfonyl-amino]-1-[[2-naphthylmethyl-(4-nitrophenyl)sulfonyl-amino]methyl]ethyl]carbamate (46d)**



Analog der **AAV4** wurden 180 mg (0.32 mmol) des Sulfonamids **45a**, 157 mg (0.71 mmol) 2-(Brommethyl)naphthalen sowie 314 mg (0.97 mmol) Cs₂CO₃ eingesetzt. Nach MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 30:1 bis 3:1) wurde das Produkt in Form eines farblosen Pulvers (138 mg, 0.16 mmol, 51 %) erhalten.

Ausbeute	138 mg (0.16 mmol, 51 %)
	farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.25 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.95 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.85-7.79 (m, 2H, -CH _{Naphthyl}); 7.73-7.65 (m, 4H, -CH _{Naphthyl}); 7.59-7.41 (m, 6H, -CH _{Naphthyl}); 7.15 (ms, 2H, -CH _{Naphthyl}); 6.36 (d, $^3J = 9.4$ Hz, -NHCO ₂ C(CH ₃) ₃); 4.42 (sbr, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.99 (ms, 1H, -NHCH); 3.10 (m, 4H, -NHCHCH ₂); 1.22 (s, 9H, -COOC(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 862.3$ ([M+Na] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₄₂ H ₄₁ N ₅ O ₁₀ SN _a): $m/z = 862.219256$
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 862.221530

4-Amino-*N*-[2-amino-3-[(4-aminophenyl)sulfonyl-benzyl-amino]propyl]-*N*-benzyl-benzensulfonamid-Hydrochlorid (47a)



Abweichend von der **AAV4** wurden 150 mg (0.27 mmol) des Sulfonamids **45a**, 101 mg (0.59 mmol) Benzylbromid sowie 222 mg (0.81 mmol) K_2CO_3 zur Reaktion gebracht. Nach Aufreinigung mittels MPLC (Gradient: *iso*-Hexan:EtOAc 30:1 bis 3:1) konnte die zweifach alkylierte Verbindung **46a** (165 mg, 0.22 mmol, 81 %) erhalten werden, die sofort in der folgenden Reaktion eingesetzt wurde. Dazu wurden 112 mg (0.15 mmol, 1 eq) des BOC-geschützten Derivats **46a** in 10 ml EtOAc gelöst und mit 341 mg (1.52 mmol, 10 eq) $Sn(II)Cl_2$ für 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht. Nach vollständiger Umsetzung wurde der pH-Wert mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung auf 7-8 eingestellt und mit 3x15 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. $NaCl$ -Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über MPLC (5 % MeOH in DCM +0.1 % $NH_3/MeOH$) und es wurden 55 mg (0.08 mmol, 56 %) eines cremefarbenen Feststoffs **47a** erhalten.

Ausbeute

55 mg (0.08 mmol, 45 % über zwei Stufen)

cremefarbener Feststoff

1H -NMR

(400 MHz, D_6 -DMSO)

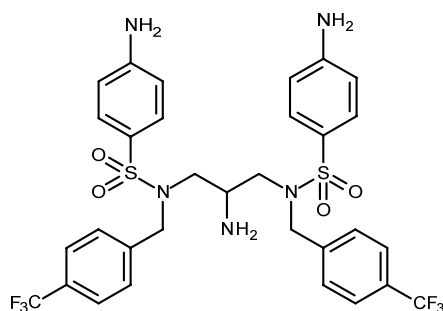
δ [ppm] = 7.92 (sbr, 3H, $-NH_3^+$); 7.36 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-SO_2CCH$); 7.26-7.21 (m, 6H, $-CH_{Benzyl}$); 7.10 (ms, 4H, $-CH_{Benzyl}$); 6.69 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, $-SO_2CCHCH$); 5.2-4.9 (sbr, 4H, NH_2C_{Ar} , H_2O Überlagerung); 4.22 (d, 2H, $^2J = 14.7$ Hz, $-CH_2C_{Ar}$); 3.69 (d, 2H, $^2J = 14.7$ Hz, $-CH_2C_{Ar}$); 3.25-3.17 (m, 1H, $NH_3^+CHCH_2$); 2.87 (dd, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, $^2J = 15.2$ Hz, $NH_3^+CHCH_2$); 2.68 (dd, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $^2J = 15.0$ Hz, $NH_3^+CHCH_2$).

MS (ES⁺, RT)

m/z = 580.1 ($[M+H]^+$); 1159.1 ($[2M+H]^+$).

HR-MS	berechnet für (C ₂₉ H ₃₄ N ₅ O ₄ S ₂): m/z =	580.205224
(ES ⁺ , RT)	gefunden:	580.207956
Smp.	197 °C	

4-Amino-N-[2-amino-3-[(4-aminophenyl)sulfonyl]-[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino]propyl]-N-[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]benzylsulfonamid (47b)

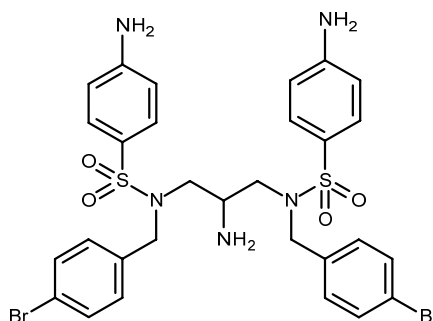


150 mg (0.169 mmol, 1 eq) des BOC-geschützten Derivats **46b** wurden in 10 ml EtOAc gelöst und mit 382 mg (1.69 mmol, 10 eq) Sn(II)Cl₂ für 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht. Nach vollständiger Umsetzung wurde der pH-Wert mit ges. NaHCO₃-Lösung auf 7-8 eingestellt und mit 3x15 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) und es wurden 84 mg (0.12 mmol, 71 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute	84 mg (0.12 mmol, 71 %)
	farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 7.59 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz, CF ₃ CCH ₂); 7.40 (2 x d, 8H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCH ₂ , CF ₃ CCHCH ₂); 6.64 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH ₂); 6.06 (s, 4H, NH ₂ C _{Ar}); 4.22 (d, 2H, $^2J = 16.3$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.02 (d, 2H, $^2J = 16.3$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 2.93 (dd, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, $^2J = 13.8$ Hz, NH ₂ CHCH ₂); 2.73 (dd, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, $^2J = 13.8$ Hz, NH ₂ CHCH ₂); 2.53 (m, 1H, NH ₂ CH); 1.17 (sbr, 2H, NH ₂)

^{13}C-NMR (100.53 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 153.7 ($\text{NH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 143.5 (CF_3CCHCHC); 129.6 (NH_2CCHCH); 128,5 (q, $^2J = 31.8$ Hz, $\text{CF}_3\text{C}_{\text{Ar}}$); 125.6 (d, $^3J = 3.9$ Hz, CF_3CCH) 125.5 (CF_3CCHCH); 124.8 (q, $^1J = 271.65$, CF_3); 123.4 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 113,4 (NH_2CCH); 55.0 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 52.9 (NH_2CHCH_2); 48.8 (NH_2CH)
MS (ES+, RT)	$m/z = 716.20$ ($[M+H]^+$)
HR-MS (ES+, RT)	berechnet für ($\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$): $m/z = 716.179993$ gefunden: 716.179761
EA	berechnet für: C: 52.02 % H: 4.37 % N: 9.78 % gefunden: C: 52.07 % H: 4.57 % N: 9.60 %
Smp.	125 °C

4-Amino-*N*-[2-amino-3-[(4-aminophenyl)sulfonyl-[(4-bromophenyl)methyl]amino]propyl]-*N*-[(4-bromophenyl)methyl]benzylsulfonamid (47c)

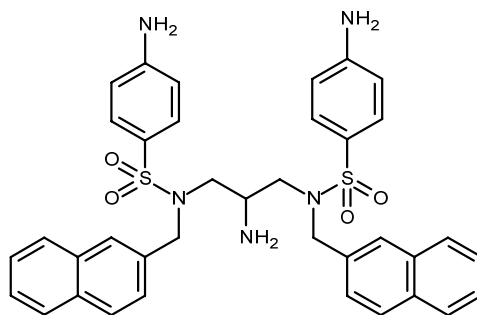


130 mg (0.145 mmol, 1 eq) des Boc-geschützten Derivats **46c** wurden in 10 ml EtOAc gelöst und mit 327 mg (1.45 mmol, 10 eq) Sn(II)Cl_2 für 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht. Nach vollständiger Umsetzung wurde der pH-Wert mit ges. NaHCO_3 -Lösung auf 7-8 eingestellt und mit 3x15 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH_3/MeOH) und es wurden 80 mg (0.11 mmol, 75 %) eines cremefarbenen Feststoffs erhalten.

Ausbeute	80 mg (0.11 mmol, 75 %) cremefarbener Feststoff
-----------------	--

¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 7.46 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.39 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, BrCCH); 7.13 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, BrCCHCH); 6.64 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 6.05 (s, 4H, NH ₂ C _{Ar}); 4.11 (d, 2H, $^2J = 15.8$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.86 (d, 2H, $^2J = 15.8$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 2.83 (dd, 2H, $^3J = 5.5$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, NH ₂ CHCH ₂); 2.68 (dd, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, NH ₂ CHCH ₂); 2.54 (m, 1H, NH ₂ CH); 1.26 (sbr, 2H, -NH ₂).
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 153.6 (NH ₂ C _{Ar}); 137.7 (BrCCHCHC); 131.7 (BrCCH); 130.6 (BrCCHCH); 129.6 (-SO ₂ CCH); 123.4 (-SO ₂ C _{Ar}); 121.0 (BrC _{Ar}); 113.4 (NH ₂ CCH); 54.4 (-CH ₂ C _{Ar}); 52.8 (NH ₂ CHCH ₂); 48.6 (NH ₂ CH).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 738.05$ ($[^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}M+H]^+$); 740.02 ($[^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}M+H]^+$).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₉ H ₃₂ ⁷⁹ Br ₂ N ₅ O ₄ S ₂): $m/z = 736.026246$ gefunden: 736.022747 berechnet für (C ₂₉ H ₃₂ ⁷⁹ Br ⁸¹ BrN ₅ O ₄ S ₂): $m/z = 738.024200$ gefunden: 738.021421
EA	berechnet für: C: 47.23 % H: 4.24 % N: 9.50 % gefunden: C: 47.59 % H: 4.52 % N: 9.25 %
Smp.	160.5 °C

4-Amino-*N*-[2-amino-3-[(4-aminophenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]propyl]-*N*-(2-naphthylmethyl)benzylsulfonamid (47d)

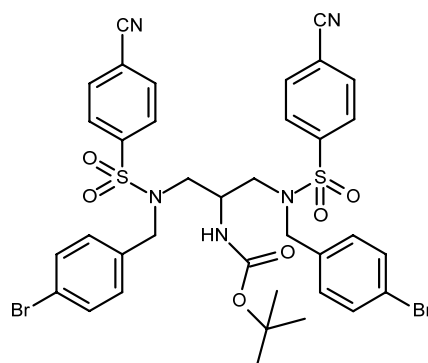


In 10 ml EtOAc wurden 120 mg (0.143 mmol, 1 eq) des Boc-geschützten Derivats **46d** gelöst und mit 324 mg (1.43 mmol, 10 eq) Sn(II)Cl₂ für 4 h bei 80 °C zur Reaktion

gebracht. Nach vollständiger Umsetzung wurde der pH-Wert mit ges. NaHCO_3 -Lösung auf 7-8 eingestellt und mit 3x15 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH_3/MeOH) und es wurden 66 mg (0.097 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute	66 mg (0.097 mmol, 68 %)
	farbloser Feststoff
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 7.85-7.80 (m, 2H, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 7.68 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 7.63 (ms, 2H, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 7.46 (ms, 4H, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 7.38 (m, 2H, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 7.37 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 7.16 (dd, 2H, $^4J = 1.6$ Hz, $^3J = 8.5$ Hz, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 6.63 (d, 4H, $^3J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 6.03 (s, 4H, $\text{NH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 4.17 (d, 2H, $^2J = 15.3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 3.88 (d, 2H, $^2J = 15.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 2.87 (dd, 2H, $^3J = 5.3$ Hz, $^2J = 13.2$ Hz, NH_2CHCH_2); 2.63 (m, 3H, NH_2CHCH_2 , NH_2CH); 1.00 (s, 2H, NH_2)
$^{13}\text{C-NMR APT}$ (100.53 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 153.6 ($\text{NH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 135.5 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 133.2 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHC}$); 132.8 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHCHC}$); 129.6 (NH_2CCHCH); 128.4, 128.1, 128.1, 126.9, 126.8, 126.5 ($-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$)*; 123.8 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 113.4 (NH_2CCH); 54.5 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 53.3 (NH_2CHCH_2); 48.2 (NH_2CH)
MS (ES+, RT)	$m/z = 680.23$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$)
HR-MS	berechnet für $(\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2)$: $m/z = 680.236524$
(ES+, RT)	gefunden: 680.238543
EA	berechnet für $^*\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$: C: 64.51 % H: 5.56 % N: 10.17 %
	gefunden: C: 64.60 % H: 5.57 % N: 10.04 %
Smp.	135 °C

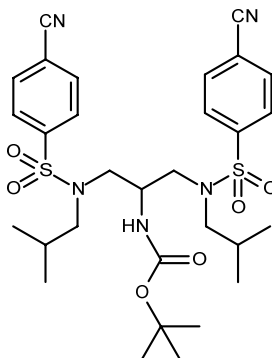
***Tert*-butyl *N*-[2-[(4-bromphenyl)methyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]-1-[[4-bromphenyl)methyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]methyl]ethyl]carbamate (**48b**)**



Der **AAV4** folgend ergab die Umsetzung von 150 mg (0.289 mmol) des Sulfonamids **45b** mit 158 mg (0.64 mmol) 4-Brombenzylbromid und 282 mg (0.87 mmol) Cs_2CO_3 nach Aufreinigung mittels MPLC (*cyclo*-Hexan:EtOAc 30:1 bis 3:1) das gewünschte Produkt als einen farblosen Feststoff (145 mg, 0.17 mmol, 59 %).

Ausbeute	145 mg (0.17 mmol, 59 %)
	farbloser Feststoff
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$)	δ [ppm] = 8.06 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 7.91 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 7.46 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.3$ Hz, BrCCH); 7.07 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, BrCCHCH); 6.28 (d, 1H, $^3J = 9.2$ Hz, $-\text{NHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 4.28 (d, 2H, $^2J = 16.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 4.23 (d, 2H, $^2J = 16.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 3.70 (sbr, 1H, NH_2CH); 3.04 (ms, 4H, NH_2CHCH_2); 1.26 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 880.15$ ($[^{79}\text{Br}^{81}\text{BrM} + \text{Na}]^+$)
HR-MS	berechnet für $(\text{C}_{36}\text{H}_{35}^{79}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2\text{Na})$: $m/z =$ 878.029320
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 878.030154
	berechnet für $(\text{C}_{36}\text{H}_{35}^{79}\text{Br}^{81}\text{BrN}_5\text{O}_6\text{S}_2\text{Na})$: $m/z =$ 880.027274
	gefunden: 880.028685
Smp.	191 °C

***Tert*-butyl *N*-[2-[(4-cyanophenyl)sulfonyl-*isobutyl*-amino]-1-[[[(4-cyanophenyl)sulfonyl-*isobutyl*-amino]methyl]ethyl]carbamate (48c)**



Unter Verwendung der **AAV4** wurden 250 mg (0.48 mmol) des Sulfonamids **45b** mit 115 μ l (1.06 mmol) *iso*-Butylbromid und 199 mg (1.44 mmol) K_2CO_3 umgesetzt. Nach Aufreinigung mittels FC (*iso*-Hexan:EtOAc 3:1) konnte das gewünschte Produkt als ein farbloser Feststoff (150 mg, 0.24 mmol, 50 %) isoliert werden.

Ausbeute

150 mg (0.24 mmol, 50 %)

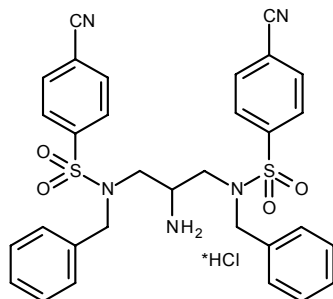
farbloser Feststoff

1H -NMR

(400 MHz, $CDCl_3$)

δ [ppm] = 8.92 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-SO_2C\bar{H}CH$); 7.85 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-SO_2C\bar{H}$); 5.37 (d, 1H, $^3J = 6.4$ Hz, $-NH\bar{B}oc$); 3.96 (m, 1H, $NHCH(CH_2)_2$); 3.34 (dd, 2H, $^2J = 14.7$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, $NHCH(\underline{CH}_{2a})_2$); 3.25 (dd, 2H, $^2J = 14.8$ Hz, $^3J = 6.5$ Hz, $NHCH(\underline{CH}_{2b})_2$); 2.92 (dd, 2H, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, $-CH_{2a}CH(CH_3)_2$); 2.87 (dd, 2H, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, $-CH_{2b}CH(CH_3)_2$); 1.95 (m, 2H, $-CH(CH_3)_2$); 1.43 (s, 9H, $-C(\underline{CH}_3)_3$); 0.88 (dd, 2H, $^2J = 15.6$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, $-CH(\underline{CH}_3)_2$).

***N*-[2-Amino-3-[benzyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]propyl]-*N*-benzyl-4-cyanobenzenesulfonamid-Hydrochlorid (48d)**

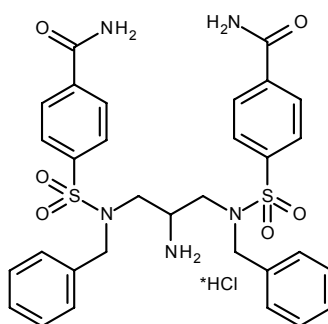


Abweichend von der **AAV4** wurden 250 mg (0.48 mmol) des Sulfonamids **45b** mit 126 μ l (1.06 mmol) Benzylbromid und 199 mg (1.44 mmol) Kaliumcarbonat in Acetonitril umgesetzt. Nach Aufreinigung mittels FC (*iso*-Hexan:EtOAc 5:1) wurde das Produkt **48a** als farbloser Feststoff (303 mg, 0.43 mmol, 90 %) gewonnen. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde dieser unter Verwendung der **AAV2** mit 2M HCl in Diethylether versetzt und das Amin als Hydrochlorid in Form eines farblosen Pulvers (170 mg, 0.27 mmol, 62 %) ausgefällt.

Ausbeute	170 mg (0.27 mmol, 56 % über 2 Stufen) farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.15 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 8.11-7.94 (m, 3H, -NH ₃ ⁺); 7.87 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.28-7.21 (m, 7H, -CH _{Ar}); 7.11-7.06 (m, 3H, -CH _{Ar}); 4.47 (d, 2H, $^2J = 14.7$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.90 (d, 2H, $^2J = 14.7$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.23 (m, 1H, NH ₂ -CH) 3.05 (dd, 2H, $^2J = 15.2$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, NH ₃ ⁺ CHCH _{2/a}); 2.77 (dd, 2H, $^2J = 15.2$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, NH ₃ ⁺ CHCH _{2/b}).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 141.4 (-SO ₂ C _{Ar}); 134.7 (-CH ₂ C _{Ar}); 133.5 (-CH _{Ar} CCN); 128.9 (-SO ₂ CCH _{Ar}); 128.6, 128.1, 127.9 (3 x CH _{Ar}); 117.5 (-C _{Ar} CN); 115.7 (-CN); 53.0 (-CH ₂ C _{Ar}); 48.6 (NH ₃ ⁺ CH(CH ₂) ₂); 47.5 (NH ₃ ⁺ CH(CH ₂) ₂).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 600.0$ ([<i>M</i> +H] ⁺).

HR-MS	berechnet für (C ₃₁ H ₃₀ N ₅ O ₄ S ₂): m/z =	600.173923
(ES ⁺ , RT)	gefunden:	600.176019
EA	berechnet für *H ₂ O: C: 56.91 % H: 4.93 % N: 10.71 %	
	gefunden: C: 56.53 % H: 5.29 % N: 10.98 %	
Smp.	240 °C	

***N*-[2-Amino-3-[benzyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]propyl]-*N*-benzyl-4-cyanobenzensulfonamid-Hydrochlorid (49a)**

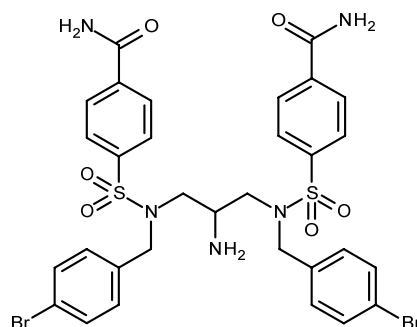


Abweichend von der **AAV4** wurden 250 mg (0.48 mmol) des Sulfonamids **45b** mit 126 µl (1.06 mmol) Benzylbromid und 199 mg (1.44 mmol) Kaliumcarbonat in Acetonitril umgesetzt. Nach Aufreinigung mittels FC (*iso*-Hexan:EtOAc 5:1) wurde das Produkt als farbloser Feststoff (303 mg, 0.43 mmol, 90 %) gewonnen. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde dieser unter Verwendung der **AAV2** mit 2M HCl in Diethylether versetzt und das Amin als Hydrochlorid in Form eines farblosen Pulvers (170 mg, 0.27 mmol, 62 %) ausgefällt.

Ausbeute	170 mg (0.27 mmol, 56 % über 2 Stufen)
	farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.27 (sbr, 2H, -CONH ₂); 8.10 (sbr, 3H, -NH ₃ ⁺); 8.09 (d, 4H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.79 (d, 4H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -SO ₂ CCH); 7.67 (sbr, 2H, -CONH ₂); 7.26-7.19 (m, 6H, 6 x -CH _{Ar}); 7.12-7.06 (m, 4H, 4 x -CH _{Ar}); 4.41 (d, 2H, ² <i>J</i> = 14.7 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.85 (d, 2H, ² <i>J</i> = 14.7 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.34 (m, 1H, NH ₃ ⁺ CH); 3.04 (dd, 2H, ² <i>J</i> = 15.2 Hz, ³ <i>J</i> = 7.6 Hz, NH ₃ ⁺ -CHCH _{2/a}); 2.74 (dd, 2H, ² <i>J</i> = 15.2 Hz,

^{13}C-NMR (100.53 MHz, D_6 -DMSO)	$^3J = 6.4 \text{ Hz, NH}_3^+ \text{-CHCH}_2/\text{b}$). δ [ppm] = 166.4 ($-\text{CONH}_2$); 139.3 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 138.4 ($-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}_2$); 134.9 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 128.9, 128.5, 128.4, 128.0, 127.3 (5 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 53.3 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 48.8 ($\text{NH}_3^+\text{CH}(\text{CH}_2)_2$); 47.7 ($\text{NH}_3^+\text{CH}(\text{CH}_2)_2$).
MS (ES+, RT)	$m/z = 636$ ($[M+H]^+$).
HR-MS (ES+, RT)	berechnet für ($\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$): $m/z = 636.195053$ gefunden: 636.193323
Smp.	202 °C

4-[[2-Amino-3-[(4-bromphenyl)methyl-(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-amino]propyl]-[(4-bromphenyl)methyl]sulfamoyl]benzamid (49b)

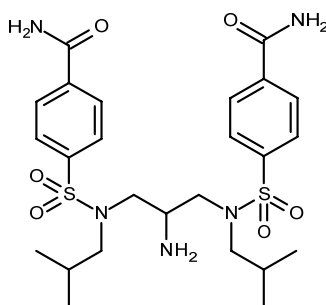


In Anlehnung an **AAV6** wurden 100 mg (0.117 mmol) der Boc-geschützten Verbindung **48b** mit 1.1 ml 30%iger H_2O_2 -Lösung zur Reaktion gebracht und das Carboxamid mittels MPLC (DCM:MeOH 20:1 +0.1 % NH_3/MeOH) aufgereinigt. Diese Zwischenstufe wurde im nächsten Schritt der **AAV2** folgend mit 2 ml 2M HCl in Et_2O entschützt und über eine MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH_3/MeOH) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt wurde als ein leicht beiges Pulver (45 mg, 0.057 mmol) in einer Ausbeute von 48 % über 2 Stufen erhalten.

Ausbeute	45 mg (0.057 mmol, 48 % über 2 Stufen) leicht beiges Pulver
^1H-NMR (400 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 8.18 (sbr, 2H, $-\text{CONH}_2$); 8.05 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5 \text{ Hz, -SO}_2\text{CCHCH}$); 7.85 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5 \text{ Hz, -SO}_2\text{CCH}$); 7.62 (sbr, 2H, $-\text{CONH}_2$); 7.46 (d, 4H,

	$^3J + ^5J = 8.5 \text{ Hz}$, BrCCH); 7.12 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.2 \text{ Hz}$, BrCCHCH); 4.27 (d, 2H, $^2J = 15.8 \text{ Hz}$, -CH ₂ C _{Ar}); 4.07 (d, 2H, $^2J = 16.0 \text{ Hz}$, -CH ₂ C _{Ar}); 2.96 (dd, 2H, $^3J = 5.3 \text{ Hz}$, $^2J = 14.2 \text{ Hz}$, NH ₂ CHCH ₂); 2.82 (dd, 2H, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, $^2J = 14.2 \text{ Hz}$, NH ₂ CHCH ₂); 2.58 (m, 1H, NH ₂ CH); 1.25 (sbr, 2H, NH ₂).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 167.1 (-CONH ₂); 141.3 (-SO ₂ C _{Ar}); 138.7 (-CH ₂ C _{Ar}); 137.0 (NH ₂ COC _{Ar}); 131.8 (BrCCH); 130.6 (-SO ₂ CCHCH); 129.0 (BrCCHCH); 127.6 (-SO ₂ CCH); 121.2 (-C _{Ar} Br); 54.2 (-CH ₂ C _{Ar}); 52.6 (NH ₂ CHCH ₂); 48.8 (NH ₂ CH).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 793.99$ ($[\text{}^{79}\text{Br}^{81}\text{BrM} + \text{H}]^+$); 796.04 ($[\text{}^{81}\text{Br}^{81}\text{BrM} + \text{H}]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₃₁ H ₃₂ ⁷⁹ Br ₂ N ₅ O ₆ S ₂): $m/z = 792.016075$
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 792.019736
	berechnet für (C ₃₁ H ₃₂ ⁷⁹ Br ⁸¹ BrN ₅ O ₆ S ₂): $m/z = 794.014029$
	gefunden: 794.015572
EA	berechnet für *H ₂ O: C: 46.88 % H: 4.10 % N: 8.63 %
	gefunden: C: 45.18 % H: 4.36 % N: 8.46 %
Smp.	185 °C

4-[[2-Amino-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-isobutyl-amino]propyl]-isobutyl-sulfamoyl]benzamid (49c)

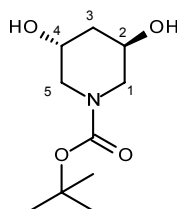


In Anlehnung an **AAV6** wurde 120 mg (0.19 mmol) der Boc-geschützten Verbindung **48c** mit 2 ml 30%iger H₂O₂-Lösung zur Reaktion gebracht und das Carboxamid als farbloser Feststoff ausgefällt. Diese Zwischenstufe wurde im nächsten Schritt der **AAV2** folgend mit 2 ml 2M HCl in Et₂O entschützt und über eine MPLC (10 % MeOH

in DCM +0.1 % NH_3/MeOH) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt wurde als eine halbfeste, leicht gelbe Substanz (65 mg, 0.11 mmol) und mit einer Ausbeute von 57 % über 2 Stufen erhalten.

Ausbeute	65 mg (0.11 mmol, 57 % über 2 Stufen)
	halbfeste, leicht gelbe Substanz
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$)	δ [ppm] = 8.17 (sbr, 2H, $-\text{CONH}_2$); 8.05 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCHCH}$); 7.87 (d, 4H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 7.60 (sbr, 2H, $-\text{CONH}_2$); 7.27, 6.65 (sbr, 3H, $-\text{NH}_3^+$); 3.12-3.01 (m, 3H, $-\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}_2\text{-CH}$); 2.92-2.81 (m, 6H, $-\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}_2\text{-CHCH}_2$); 1.88 (m, 2H, $-\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.82 (d, 6H, $^3J = 6.6$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.79 (d, 6H, $^3J = 6.6$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).
$^{13}\text{C-NMR APT}$ (100.53 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$)	δ [ppm] = 166.5 ($-\text{CONH}_2$); 141.0 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 137.9 ($-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}_2$); 128.3 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CHCH}$); 127.0 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}$); 57.1 ($-\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 53.3 ($\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2$); 48.8 ($\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2$); 26.5 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 22.4 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 19.8 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).
MS (ES+, RT)	$m/z = 568.0$ ($[M+H]^+$); 1135.2 ($[2M+H]^+$).
HR-MS	berechnet für ($\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$): $m/z =$ 568.226353
(ES+, RT)	gefunden: 568.223951
Smp.	122 °C

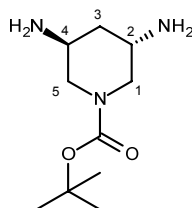
***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-dihydroxypiperidin-1-carboxylat (**55**)**



Unter Verwendung der **AAV5** wurden 15 g (45.2 mmol, 1 eq) der TBS-geschützten Piperidinverbindung **103** mit 54.2 ml einer 1M TBAF-Lösung in THF umgesetzt und das Diol **55** wurde nach einer FC (5 % MeOH in DCM) als ein leicht beiger Feststoff (6.9 g, 31.8 mmol) mit einer Ausbeute von 70 % erhalten.

Ausbeute	9.6 g (31.8 mmol, 70 %)
	leicht beiger Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 4.64 (s, 2H, -OH); 3.76 (ms, 2H, H ₂ , H ₄); 3.36 (sbr, 2H, H _{1a} , H _{5a}); 3.13 (sbr, 1H, H _{1b})*; 2.98 (sbr, 1H, H _{5b})*; 1.59 (s, 2H, H ₃); 1.38 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 154.6 (-C(=O)O(CH ₃) ₃); 78.2 (-C(CH ₃) ₃); 62.4 (Rotamere, C ₂ /C ₄); 50.1 (Rotamere, C ₁ /C ₅); 40.1 (C ₃); 28.0 (-C(CH ₃) ₃).
MS (EI+, 70 eV)	m/z (%) = 217 (68 [M (C ₁₀ H ₁₉ NO ₄) ⁺], 162 (54), 161 (100), 158 (34), 144 (78), 143 (32), 117 (27), 99 (50), 89 (38), 57 (77), 44 (59), 41 (28).
HR-MS (EI+, 70 eV)	berechnet für (C ₁₀ H ₁₉ NO ₄): m/z = 217.131408 gefunden: 217.131467
EA	berechnet: C: 55.28 % H: 8.81 % N: 6.45 % gefunden: C: 55.28 % H: 8.73 % N: 6.46 %
Smp.	135 °C

***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3,5-diaminopiperidin-1-carboxylat (**56**)**

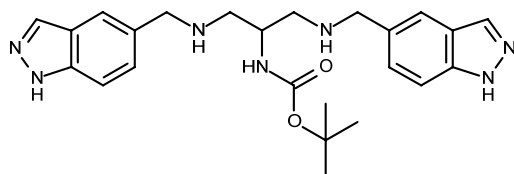


In einem Dreihalskolben unter Argon mit Trockenrohr und Thermometer wurden 2.70 g (10.31 mmol, 5.6 eq) Triphenylphosphin vorgelegt, in 17 ml trockenem THF gelöst und in einem Eis-Salzbad auf -15 °C gekühlt. Bei der tropfenweisen Zugabe von 812 μ l (5.16 mmol, 2.8 eq) Diethylazodicarboxylat durfte die Temperatur nicht über -10 °C steigen. Anschließend wurde für 30 min gerührt bevor 400 mg (1.84 mmol, 1 eq) des 1,3-Diols **55** in einer Portion zugegeben wurde. Es wurde weitere 30 min gerührt und 1.19 ml (5.52 mmol, 3 eq) DPPA wurden ebenfalls langsam zugetropft ohne die Temperatur ansteigen zu lassen. Innerhalb der nächsten 10 h ließ man den

Reaktionsansatz im Eis-Salzbad langsam auf RT aufwärmen. Nach weiteren 5 h bei RT und falls der Reaktionsfortschritt abgeschlossen war, wurden 6 ml 25%ige NH_3/aq -Lösung zugegeben und über Nacht hydrolysiert. Anschließend wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt, der klebrige Rückstand vorsichtig auf Kieselgel aufgezogen und mittels MPLC (Aminphase, 10 % MeOH in DCM + 0.1 % NH_3/MeOH) aufgereinigt. Das Bisamin **56** wurde als gelbes Öl (200 mg 0.93 mmol) in einer Ausbeute von 50 % erhalten.

Ausbeute	200 mg (0.93 mmol, 50 %)
	gelbes Öl
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 3.70-3.37 (sbr, 2H, H2, H4); 3.19-3.02 (mbr, 4H, H1, H5); 1.98 (sbr, 4H, $-\text{NH}_2$) 1.60 (mbr, 2H, H3); 1.42 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
$^{13}\text{C-NMR APT}$ (100.53 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 155.5 ($-\text{COO}(\text{CH}_3)_3$); 79.8 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 51.2 (Rotamere, C1, C5); 44.4 (Rotamere, C2, C4); 41.2 (C3); 28.4 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
MS (ES+, RT)	m/z (%) = 216.0 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$)
HR-MS	berechnet für ($\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$): m/z = 216.171202
(ES+, RT)	gefunden: 216.169962
EA	berechnet für $*1\frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$: C: 50.51 % H: 9.96 % N: 17.67 %
	gefunden: C: 50.60 % H: 9.75 % N: 17.29 %

***Tert*-butyl *N*-[2-(1*H*-indazol-5-ylmethylamino)-1-[(1*H*-indazol-5-ylmethylamino)methyl]ethyl]carbammat (**60b**)**

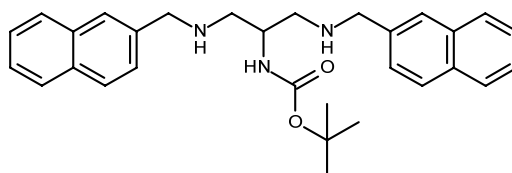


Das Diamin **39** (200 mg, 1.06 mmol, 1 eq) wurde zusammen mit Indazol-5-carboxaldehyd (340 mg, 2.33 mmol, 2.2 eq) und Pd/BaSO_4 (10 %) in MeOH (*HPLC-grade*) suspendiert und unter H_2 -Atmosphäre für 12 h hydriert. Das zweifach alkylierte

Produkt **60b** wurde mittels MPLC (10 % MeOH in DCM mit 0.1 % NH_3/MeOH) aufgereinigt und als farbloser Feststoff (200 mg, 0.44 mmol, 42 %) erhalten.

Ausbeute	200 mg (0.44 mmol, 42 %)
	farbloses Pulver
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$)	δ [ppm] = 12.96 (sbr, 2H, $-\text{NH}$); 7.96 (sbr, 2H, $\text{CH}=\text{N}$); 7.61 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}$); 7.44 (d, 2H, $^3J = 8.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}$)*; 7.29 (d, 2H, $^3J = 8.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}$)*; 6.56 (d, 1H, $^3J = 4.6$ Hz, $-\text{NHBoc}$); 4.04 (sbr, 2H, $-\text{NHCH}_2$); 3.77 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 3.70 (sbr, 1H, BocNHCH); 2.60 (m, 4H, $-\text{NHCHCH}_2$); 1.37 (sbr, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
MS (ES+, RT)	$m/z = 450.1$ ($[M+\text{H}]^+$); 472.2 ($[M+\text{Na}]^+$); 899.4 ($[2M+\text{H}]^+$).
HR-MS	berechnet für $(\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_2)$: $m/z =$ 450.261749
(ES+, RT)	gefunden: 450.258553
Smp.	197 °C

***Tert*-butyl *N*-[2-(2-naphthylmethylamino)-1-[(2-naphthylmethylamino)methyl]ethyl]carbammat (**60d**)**

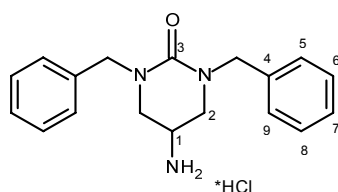


Das Diamin **39** (150 mg, 0.78 mmol, 1 eq) wurde zusammen mit 2-Naphtaldehyd (248 mg, 1.56 mmol, 2 eq) und Pd/BaSO_4 (10 %) in MeOH (*HPLC-grade*) suspendiert und unter H_2 -Atmosphäre für 12 h hydriert. Das zweifach alkylierte Produkt wurde mittels MPLC (Gradient DCM:MeOH 24:1 bis 9:1) aufgereinigt und als gelber Harz (160 mg, 0.34 mmol, 44 %) erhalten.

Ausbeute	160 mg (0.34 mmol, 44 %)
	gelber Harz
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$)	δ [ppm] = 7.89-7.77 (m, 8H, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 7.51-7.45 (m, 6H, $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 6.70 (d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz; $-\text{NHBoc}$); 3.93 (s, 4H,

-CH₂C_{Ar}); 3.80 (mbr, 1H, -NHCH); 2.74 (dd, 2 H, ²J = 12.0 Hz; ³J = 6.4 Hz; -CHCH₂(A)); 2.66 (dd, 2 H, ²J = 11.9 Hz; ³J = 6.4 Hz; -CHCH₂(B)); 1.38 (sbr, 9H, -C(CH₃)₃).

5-Amino-1,3-bis(1*H*-indazol-5-ylmethyl)hexahydropyrimidin-2-on-Hydrochlorid (61a)

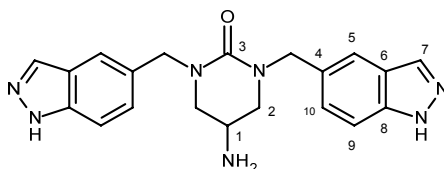


Das Diamin **39** (100 mg, 0.53 mmol, 1 eq) wurde zusammen mit Benzaldehyd (117.5 µl, 1.16 mmol, 2.2 eq) und Pd/BaSO₄ (10 %) in MeOH (*HPLC-grade*) suspendiert und unter H₂-Atmosphäre für 12 h hydriert. Das zweifach alkylierte Produkt **60a** wurde mittels MPLC (4 % MeOH in DCM) aufgereinigt und als gelbes Öl (135 mg, 0.37 mmol, 69 %) erhalten. Dieses wurde in 10 ml DCM gelöst und mit Carbonyldiimidazol (44 mg, 0.27 mmol, 0.7 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufreinigung über MPLC (33 % EtOAc in *iso*-Hexan) wurde das zyklisierte Produkt als farbloses Pulver isoliert und sofort unter Verwendung der **AAV2** entschützt. Das ausgefällte Hydrochlorid wurde mit Diethylether gewaschen und das gewünschte Produkt als farbloser Feststoff (40 mg, 0.14 mmol, 26 % über 3 Stufen) erhalten.

Ausbeute	40 mg (0.14 mmol, 26 % über 3 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.40 (sbr, 3H, -NH ₃ ⁺); 7.38-7.33 (m, 4H, 4 x CH _{Ar}); 7.31-7.24 (m, 6H, 6 x CH _{Ar}); 4.76 (d, 2H, ² J = 15.1 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.27 (d, 2H, ² J = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.67 (m, 1H, NH ₃ ⁺ CH); 3.41 (dd, 2H, ² J = 12.1 Hz, ³ J = 4.1 Hz, -CHCH _a CH _b); 3.24 (dd, 2H, ² J = 12.3 Hz, ³ J = 5.7 Hz, -CHCH _a CH _b).
¹³C-NMR APT	δ [ppm] = 154.7 (-CO); 138.0 (-CH ₂ C _{Ar}); 128.4

(100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	(-CH ₂ CCH _{CH}); 127.5 (-CH ₂ C _{CH}); 127.0 (-CH ₂ CCHCH _{CH}); 50.7 (NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 47.1 (-CH ₂ C _{Ar}); 42.5 (NH ₃ ⁺ CH).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 296$ ($[M+H]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₁₈ H ₂₂ N ₃ O): $m/z =$ 296.176288
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 296.173728
EA	berechnet für * $\frac{1}{4}$ H ₂ O: C: 64.28 % H: 6.74 % N: 12.49 % gefunden: C: 64.45 % H: 6.80 % N: 12.32 %
Smp.	275 °C (Zersetzung)

5-Amino-1,3-bis(1*H*-indazol-5-ylmethyl)hexahydropyrimidin-2-on (61b)

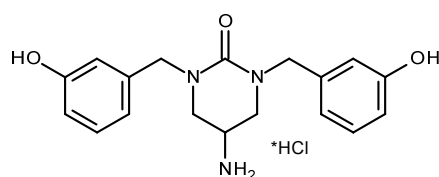


Verbindung **60b** (151 mg, 0.35 mmol, 1.7 eq) wurde in 10 ml DCM gelöst und mit Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat (60 mg, 0.20 mmol, 1 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufreinigung über MPLC (5 % MeOH in DCM) wurde das zyklisierte Produkt als farbloses Pulver isoliert und sofort unter Verwendung der **AAV2** entschützt. Das ausgefällte Hydrochlorid wurde über MPLC (10 % MeOH in DCM + 0.1 % NH₃/MeOH) aufgereinigt und das gewünschte Produkt **61b** als farbloser Feststoff (55 mg, 0.15 mmol, 77 % über 2 Stufen) erhalten.

Ausbeute	55 mg (0.15 mmol, 77 % über 2 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 13.01 (sbr, 2H, -NH); 8.03 (sbr, 2H, CH=N); 7.63 (sbr, 2H, CH ₂ C _{Ar} CH _{CH}); 7.52 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, -CH ₂ C _{Ar} CH _{CH})*; 7.31 (d, 2H, ³ J = 8.5 Hz, CH ₂ C _{Ar} CH _{CH})*; 4.60 (d, 2H, ² J = 14.7 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.55 (d, 2H, ² J = 14.7 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.16 (dd, 2H, ² J = 11.1 Hz, ³ J = 4.6 Hz, -CHCH _a CH _b); 3.02 (m, 1H, H1); 2.83 (dd, 2H, ² J = 11.1 Hz, ³ J = 8.7 Hz, -CHCH _a CH _b); 1.66 (sbr, 2H, NH ₂).

¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 155.2 (C3); 130.6 (C4); 126.3 (C5, C10); 122.8 (C6); 119.0 (C9); 117.1 (C8); 110.2 (C7); 52.5 (C2); 50.7 (-CH ₂ C _{Ar}); 43.6 (C1).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 376.0 ([M+H] ⁺); 398.0 ([M+Na] ⁺); 414.2 ([M+K] ⁺); 773.5 ([2M+Na] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₀ H ₂₂ N ₇ O): m/z = 376.188584 gefunden: 376.187862
EA	berechnet für *1¼H ₂ O: C: 60.36 % H: 5.95 % N: 24.64 % gefunden: C: 60.62 % H: 6.03 % N: 24.49 %
Smp.	205-206 °C

5-Amino-1,3-bis[(3-hydroxyphenyl)methyl]hexahydropyrimidin-2-on-Hydrochlorid (61c)



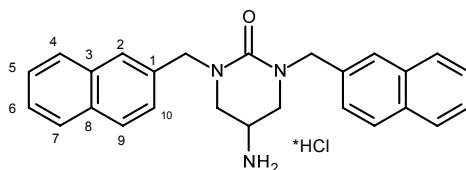
Zur Herstellung des benötigten 3-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]benzaldehyd wurde 3-Hydroxybenzaldehyd (1.5 g, 12.3 mmol, 1 eq) in 30 ml trockenem DCM gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Imidazol (1.00 g, 14.7 mmol, 1.2 eq) und TBSCl (2.2 g, 14.3 mmol, 1,16 eq) zugesetzt und für 4.5 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde noch mit 2 %iger HCl (2 x 10 ml), H₂O (2 x 10 ml) und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Der geschützte Aldehyd wurde als eine farblose Flüssigkeit (2.8 g, 11.8 mmol, 96 %) isoliert. [150]

Das Diamin **39** (150 mg, 0.78 mmol, 1 eq) wurde zusammen mit 3-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]benzaldehyd (375 mg, 1.56 mmol, 2 eq) und Pd/BaSO₄ (10 %) in MeOH (*HPLC-grade*) suspendiert und unter H₂-Atmosphäre für 12 h hydriert. Das zweifach alkylierte Produkt **60c** wurde mittels MPLC (Gradient DCM:MeOH 50:1 bis 9:1) aufgereinigt und als farbloses Öl (207 mg, 0.33 mmol, 42 %) erhalten. Verbindung **60c** (193 mg, 0.31 mmol, 1.5 eq) wurde in 10 ml DCM gelöst und mit Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat (62 mg, 0.20 mmol, 1 eq) versetzt. Das

Reaktionsgemisch wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufreinigung über MPLC (5 % MeOH in DCM) wurde das zyklisierte Produkt als farbloses Pulver isoliert und sofort unter Verwendung der AAV2 entschützt. Das ausgefällt Hydrochlorid **61c** wurde mit Et₂O gewaschen und das gewünschte Produkt als farbloser Feststoff (59 mg, 0.16 mmol, 52 % über 2 Stufen) erhalten.

Ausbeute	59 mg (0.16 mmol, 21 % über 4 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.38 (s, 2H, -OH); 8.40 (sbr, 3H, NH ₃ ⁺); 7.12 (t, 2H, ³ J = 7.6 Hz, HOCCHCH); 6.75-6.59 (m, 6H, C _{Ar} H); 4.69 (d, 2H, ² J = 15.1 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.17 (d, 2H, ² J = 15.1 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.65 (sbr, 1H, NH ₃ ⁺ CH); 3.39 (dd, 2H, ² J = 12.3 Hz, ³ J = 4.4 Hz, NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 3.23 (dd, 2H, ² J = 12.1 Hz, ³ J = 6.2 Hz, NH ₃ ⁺ CHCH ₂).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 158.2 (-C _{Ar} OH); 155.1 (-C=O); 139.9 (-CH ₂ C _{Ar}); 130.0 (HOCCHCH); 118.6 (HOCCHCHCH); 115.0 (HOCCHCH); 114.7 (HOCCHCH); 51.2 (NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 47.6 (-CH ₂ C _{Ar}); 43.1 (NH ₃ ⁺ CH).
MS (EI+, 70 eV)	m/z = 327 (100, [M] ⁺).
HR-MS (EI+, 70 eV)	berechnet für (C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₃): m/z = 327.158292 gefunden: 327.154657
EA	berechnet für *H ₂ O: C: 56.62 % H: 6.34 % N: 11.00 % gefunden: C: 56.94 % H: 5.97 % N: 10.63 %
Smp.	325 °C (Zersetzung)

5-Amino-1,3-bis(2-naphthylmethyl)hexahydropyrimidin-2-on-Hydrochlorid (**61d**)

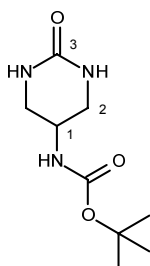


Verbindung **60d** (123 mg, 0.26 mmol, 1.5 eq) wurde in 10 ml DCM gelöst und mit Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat (53 mg, 0.18 mmol, 1 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch

wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufreinigung über MPLC (5 % MeOH in DCM) wurde das zyklisierte Produkt als farbloses Pulver isoliert und sofort unter Verwendung der **AAV2** entschützt. Das ausgefällte Hydrochlorid wurde mit Et₂O gewaschen und das gewünschte Produkt **61d** als farbloser Feststoff (55 mg, 0.13 mmol, 71 % über 2 Stufen) erhalten.

Ausbeute	55 mg (0.13 mmol, 71 % über 2 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.71 (sbr, 3H, NH ₃ ⁺); 7.81-7.65 (m, 8H, 8 x -CH _{Naphthyl}); 7.44-7.32 (m, 6H, 6 x -CH _{Naphthyl}); 5.00 (d, ² J = 14.9 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.44 (d, ² J = 14.9 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.54 (m, 1H, NH ₃ ⁺ CH); 3.44 (ms, 4H, NH ₃ ⁺ CHCH ₂).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 155.4 (-C=O); 136.2 (C1); 133.5 (C3); 132.9 (C8); 128.8 (C6); 128.15 (C5); 128.10 (C2); 126.8 (C9); 126.6 (C4); 126.5 (C7); 126.3 (C10); 51.5 (NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 47.7 (-CH ₂ C _{Ar})*; 43.2 (NH ₃ ⁺ CH)*.
MS (EI+, 70 eV)	m/z = 395 (60, [M] ⁺); 254 (28); 141 (100); 129 (32).
HR-MS (EI+, 70 eV)	berechnet für (C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O): m/z = 395.199763 gefunden: 395.200090
EA	berechnet für *2H ₂ O: C: 66.73 % H: 6.46 % N: 8.98 % gefunden: C: 66.78 % H: 5.88 % N: 8.72 %
Smp.	283 °C (Zersetzung)

Tert-butyl N-(2-oxohexahydropyrimidin-5-yl)carbamat (**62**)

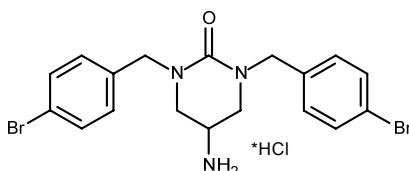


In trockenem DCM (88 ml) wurden 466 mg (2.46 mmol, 1.07 eq) des Diamins **39** vorgelegt, bei RT mit 700 mg (2.30 mmol, 1 eq) Bis-(4-nitrophenyl)-carbonat versetzt

und anschließend wurde für 48 h unter RF erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotavapor unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt und der Rückstand über MPLC (5 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) aufgereinigt. Das zyklisierte Produkt **62** wurde mit einer Ausbeute von 80 % in Form eines schwach gelben Feststoffs (400 mg, 1.86 mmol) erhalten

Ausbeute	400 mg (1.86 mmol, 80 %)
	schwach gelber Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 6.84 (d, 1H, ³ J = 6.0 Hz, -NH <u>B</u> oc); 6.04 (sbr, 2H, -NHC=O); 3.62 (m, 1H, H1); 3.15 (m, 2H, H2 _a); 2.94 (dd, 2H, ² J = 10.8, ³ J = 8.5, H2 _b); 1.39 (s, 9H, -C(<u>C</u> H ₃) ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 155.3 (-C <u>O</u> ₂ C(CH ₃) ₃); 155.1 (-C <u>=</u> O); 78.2 (-C(<u>C</u> H ₃) ₃); 43.6 (-C <u>H</u> ₂ NH); 42.8 (-CHC <u>H</u> ₂ NH); 28.1 (-C(<u>C</u> H ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 238 ([M+Na] ⁺); 254 ([M+K] ⁺); 270 ([M+Na+MeOH] ⁺); 453 ([2M+Na] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₃ Na): m/z = 238.116761 gefunden: 238.117295
EA	berechnet: C: 50.22 % H: 7.96 % N: 19.52 % gefunden: C: 49.97 % H: 8.02 % N: 19.57 %
Smp.	162.1-162.6 °C

5-Amino-1,3-bis[(4-bromophenyl)methyl]hexahydropyrimidin-2-on-Hydrochlorid (**63a**)

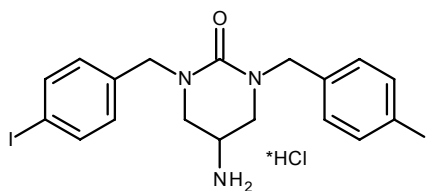


In 2.4 ml trockenem THF wurde der zyklisierte Harnstoff **62** (60 mg, 0.28 mmol, 1 eq) gelöst und bei RT mit 4-Brombenzylbromid (697 mg, 2.79 mmol, 10 eq) versetzt. Kalium-*tert*-butanolat (156 mg, 1.40 mmol, 5 eq), in 2 ml trockenem THF gelöst, wurde langsam zum Ansatz getropft. Nach 5 h bei RT wurde über Nacht unter RF erhitzt und

anschließend unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. (Vorschrift in Anlehnung an [121]) Die Aufreinigung des zweifach alkylierten Produkts erfolgte über MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 1:1), welches im Anschluss unter Verwendung der **AAV2** geschützt wurde. Das ausgefällte Hydrochlorid **63a** wurde mit Et₂O gewaschen und als farbloser Feststoff (55 mg, 0.12 mmol, 44 %) isoliert.

Ausbeute	55 mg (0.12 mmol, 44 % über 2 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.35 (sbr, 3H, NH ₃ ⁺); 7.55 (d, 4H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.2 Hz, BrCCH); 7.27 (d, 4H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, BrCCHCH); 4.69 (d, 2H, ² <i>J</i> = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.27 (d, 2H, ² <i>J</i> = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.68 (sbr, 1H, NH ₃ ⁺ CH); 3.43 (m, 2H, NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 3.23 (dd, 2H, ³ <i>J</i> = 5.0 Hz, ² <i>J</i> = 12.1 Hz, NH ₃ ⁺ CHCH ₂).
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 155.2 (-C=O); 138.4 (-CH ₂ C _{Ar}); 131.9 (BrCCH); 130.5 (BrCCHCH); 120.8 (BrC _{Ar}); 50.8 (NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 47.6 (-CH ₂ C _{Ar}); 43.1 (NH ₃ ⁺ CH).
MS (ES ⁺ , RT)	<i>m/z</i> = 454.1 ([<i>M</i> +H] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₁₈ H ₂₀ ⁷⁹ Br ⁸¹ BrN ₃ O): <i>m/z</i> = 453.995264 gefunden: 453.996946
EA	berechnet für *2H ₂ O: C: 41.13 % H: 4.60 % N: 7.99 % gefunden: C: 41.52 % H: 4.55 % N: 7.45 %
Smp.	204 °C

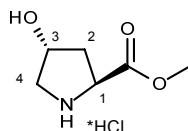
5-Amino-1,3-bis[(4-iodophenyl)methyl]hexahydropyrimidin-2-on-Hydrochlorid (63b)



In 2.4 ml trockenem THF wurde der zyklisierte Harnstoff **62** (60 mg, 0.28 mmol, 1 eq) gelöst und bei RT mit 4-Iodbenzylbromid (828 mg, 2.79 mmol, 10 eq) versetzt. Kalium-*tert*-butanolat (156 mg, 1.40 mmol, 5 eq), in 2 ml trockenem THF gelöst, wurde langsam zum Ansatz getropft. Nach 5 h bei RT wurde über Nacht unter RF erhitzt und anschließend unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. (Vorschrift in Anlehnung an [121]) Die Aufreinigung des zweifach alkylierten Produkts erfolgte über MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 1:1), welches im Anschluss unter Verwendung der **AAV2** entschützt wurde. Das ausgefällte Hydrochlorid **63b** wurde mit Et₂O gewaschen und als leicht gelber Feststoff (66 mg, 0.12 mmol, 44 %) isoliert.

Ausbeute	66 mg (0.12 mmol, 44 % über 2 Stufen) leicht gelber Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.33 (sbr, 3H, NH ₃ ⁺); 7.70 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.2 Hz, ICCH); 7.08 (d, 4H, ³ J + ⁵ J = 8.2 Hz, ICCHCH); 4.64 (d, 2H, ² J = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.21 (d, 2H, ² J = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.64 (sbr, 1H, NH ₃ ⁺ CH); 3.39 (dd, 2H, ² J = 12.4 Hz, ³ J = 3.9 Hz, NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 3.18 (dd, 2H, ² J = 12.1 Hz, ³ J = 5.0 Hz, NH ₃ ⁺ CHCH ₂).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 155.2 (-C=O); 138.4 (-CH ₂ C _{Ar}); 137.8 (ICCH); 130.6 (ICCHCH); 93.6 (IC _{Ar}); 50.8 (NH ₃ ⁺ CHCH ₂); 47.6 (-CH ₂ C _{Ar}); 43.1 (NH ₃ ⁺ CH).
MS (ES ⁺ , RT)	<i>m/z</i> = 548.1 ([M+H] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₁₈ H ₂₀ I ₂ N ₃ O): <i>m/z</i> = 547.969591 gefunden: 547.967692
EA	berechnet für *2½H ₂ O: C: 34.39 % H: 4.01 % N: 6.68 % gefunden: C: 34.44 % H: 4.34 % N: 6.74 %

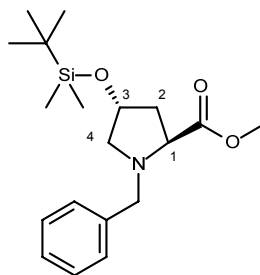
Smp.	315 °C (Zersetzung)
-------------	---------------------

Methyl (2*S*,4*R*)-4-hydroxypyrrolidin-1-ium-2-carboxylat chlorid (99a)


12.5 g (95.3 mmol, 1 eq) (2*S*,4*R*)-4-Hydroxypyrrolidin-2-carbonsäure wurden unter Argon in 170 ml Methanol suspendiert und im Eis-Salzbad auf 0 °C gekühlt. Nachdem 26.6 ml (209.7 mmol, 2.2 eq) TMSCl langsam zugetropft worden waren, wurde langsam auf RT aufgewärmt und für 12 h gerührt. Die jetzt klare Lösung wurde anschließend mit 550 ml Et₂O versetzt, wodurch ein flockiger, weißer Niederschlag ausgefällt wurde. Die Fällung wurde bei 4 °C vervollständigt, der Niederschlag abfiltriert und mit Et₂O gewaschen. Die so erhaltenen farblosen Nadeln wurden im Hochvakuum getrocknet und es konnten 17.2 g (95 mmol, 99.7 %) des Methylesters **99a** erhalten werden. (Literatur:[151])

Ausbeute	17.8 g (95 mmol, 99.7 %) farblose Nadeln
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.83 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 5.58 (sbr, 1H, -OH); 4.46 (dd, 1H, ³ <i>J</i> = 10.9, 7.5, H1); 4.41 (sbr, 1H, H3); 3.75 (s, 3H, -OCH ₃); 3.36 (dd, 1H, ² <i>J</i> = 12.0, ⁴ <i>J</i> = 4.3, H4); 3.06 (td, 1H, ² <i>J</i> = 12.0, ⁴ <i>J</i> = 1.5, H4); 2.19 (tdd, 1H, ² <i>J</i> = 13.3, ³ <i>J</i> = 7.2, ⁴ <i>J</i> = 1.5, H2); 2.09 (ddd, 1H, ² <i>J</i> = 13.3, ³ <i>J</i> = 11.0, ⁴ <i>J</i> = 4.3, H2).
Smp.	170–171 °C

Methyl-(2*S*,4*R*)-1-benzyl-4-(*tert*-butyl(dimethylsilyl)oxy)-pyrrolidin-2-carboxylat (100)



Zu einer Lösung von 12.5 g (86.1 mmol, 1 eq) Methylester **99a** in 235 ml DCM unter Argon wurde 48.3 ml (244.4 mmol, 4 eq) Triethylamin bei 0 °C zugetropft. Anschließend wurden 12.3 ml (103.3 mmol, 1.2 eq) Benzylbromid langsam zugegeben und die Reaktionslösung wurde noch 15 min im Eisbad gerührt bevor auf RT aufgewärmt wurde. Nach 5 h wurde 1.1 g (8.6 mmol, 0.1 eq) DMAP und 14.3 g (94.7 mmol, 1.1 eq) TBDMSCl bei 0 °C der Reaktionslösung zugesetzt und anschließend für 12 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung bis zu einem pH-Wert von 10 gequentscht und die wässrige Phase mit 3x100 ml DCM gefolgt von 3x100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde über eine FC (*iso*-Hexan:EtOAc 7:3) aufgereinigt, um 19.6 g (56.0 mmol) eines farblosen Öls, mit einer Ausbeute von 65 % über 2 Stufen, zu isolieren. Die Synthesevorschrift sowie die Charakterisierung des Produktes wurde auf Basis von [145] durchgeführt.

Ausbeute

19.6 g (56.0 mmol, 65 % über 2 Stufen)

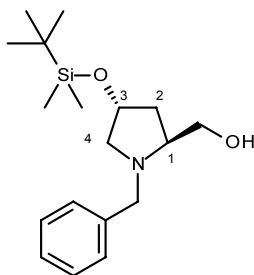
farbloses Öl

¹H-NMR

(400 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 7.32-7.21 (m, 5H, -CH_{Ar}); 4.36-4.29 (m, 1H, H1); 3.86 (d, 1H, ²*J* = 13.3, -NCH₂C_{Ar}); 3.58 (s, 3H, -OCH₃); 3.54 (d, 1H, ²*J* = 13.3, -NCH₂C_{Ar}); 3.49 (t, 1H, ³*J* = 7.7, H3); 3.08 (dd, 1H, ²*J* = 9.6, ³*J* = 5.7, H4); 2.28 (dd, 1H, ²*J* = 9.6, ³*J* = 4.7, H4); 2.09 (ddd, 1H, ²*J* = 13.2, ³*J* = 7.2, 7.2, H2); 1.90 (ddd, 1H, ²*J* = 12.7, ³*J* = 8.3, 4.3, H2); 0.84 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃); 0.02 (s, 3H, -Si(CH₃)₂); 0.01 (s, 3H, -Si(CH₃)₂) .

[(2*S*,4*R*)-1-Benzyl-4-(*tert*-butyl(dimethylsilyl)oxy)-pyrrolidin-2-yl]methanol (101**)**



In einem 2-L-Vierhalskolben unter Argon mit Thermometer, Tropftrichter und KPG-Rührer wurden 28 g (80.1 mmol, 1 eq) des Pyrrolidines **100** in 400 ml trockenem THF vorgelegt. Der Reaktionsansatz wurde auf -78 °C gekühlt und 116.7 ml (176.2 mmol, 2.2 eq) einer 25%wt DIBAL-H Lösung wurde vorsichtig zugetropft ohne die Temperatur über -70 °C ansteigen zu lassen. Nach vollständiger Zugabe wurde der Ansatz langsam innerhalb von 3 h auf 0 °C aufgewärmt und noch für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Für die Zugabe der Quentschlösung (24 ml, H₂O:THF, 1:2) wurde wieder auf -30 °C runtergeköhlt. Nachdem die gesamte Lösung vorsichtig und langsam zugetropft worden war, wurden 480 ml Diethylether, 400 ml Rochelle-Lösung und 140 ml ges. NH₄Cl-Lösung zum Ansatz hinzugefügt. Nach kurzer Zeit bildete sich eine Gallerte, die durch Rühren über Nacht verschwand und es bildete sich eine Phasengrenze. Die wässrige Phase wurde noch mit 3x300 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde über eine FC (*iso*-Hexan:EtOAc 5:2) aufgereinigt und es wurden 21.2 g (66.0 mmol, 83 %) des gewünschten Produkts als leicht gelbes Öl gewonnen. Die experimentell bestimmten NMR-Daten stimmen mit publizierten Daten für diese Verbindung überein. [145]

Ausbeute

21.2 g (66.0 mmol, 83 %)

leicht gelbes Öl

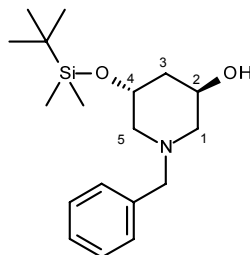
¹H-NMR

(400 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 7.31-7.20 (m, 5H, -CH_{Ar}); 4.38 (t, 1H, ³*J* = 5.4, -OH); 4.20 (ms, 1H, H₃); 4.02 (d, 1H, ²*J* = 13.2, -CH₂C_{Ar}); 3.40 (ms, 1H, -CH₂OH); 3.39 (d, 1H, ²*J* = 13.5, -CH₂C_{Ar}); 3.29-3.22 (m, 1H, -CH₂OH); 2.97 (dd, 1H, ²*J* = 9.5, ³*J* = 5.7, H₄); 2.82 (ms, 1H, H₁); 2.13 (dd, 1H, ²*J* = 9.5, ³*J* = 5.7, H₄);

1.82 (ddd, 1H, $^2J = 12.9$, $^3J = 7.2$, H2); 1.71 (ddd, 1H, $^2J = 12.8$, $^3J = 8.2$, 4.6, H2); 0.83 (s, 9H, -Si(CH₃)₃); 0.06 (s, 3H, -Si(CH₃)₂); -0.01 (s, 3H, -Si(CH₃)₂).

(3*R*,5*R*)-1-benzyl-5-(*tert*-butyl(dimethyl)silyloxy)-piperidin-3-ol (102)



Die Ringerweiterung zum Piperidin wurde in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte Synthesevorschrift durchgeführt. [144] Dazu wurden 12 g (37.3 mmol, 1 eq) des primären Alkohols **101** in 300 ml THF unter Argon gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Zum Ansatz wurden langsam 6.3 ml (44.8 mmol, 1.2 eq) Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft und für 1 h weiter gerührt. Anschließend wurde 20.9 ml (149,3 mmol, 4 eq) Triethylamin bei 0°C zugesetzt und nach 20 min für 3 Tage unter RF erhitzt, auf RT abgekühlt 90 ml einer 2.5 M NaOH-Lösung zugegeben. Nach weiteren 2 h Rühren bei RT wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde über eine FC (*iso*-Hexan:EtOAc 7:3) aufgereinigt und 11.1 g (34.5 mmol, 93%) eines orangefarbenen Öls wurden als das gewünschte Produkt **102** isoliert.

Ausbeute

11.1 g (34.5 mmol, 93 %)

orangefarbiges Öl

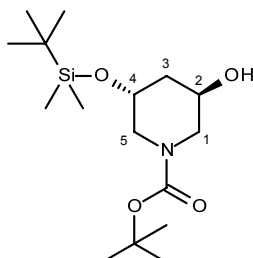
¹H-NMR

(400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 7.38-7.23 (m, 5H, -CH_{Ar}); 4.04 (ddd, 1H, $^3J = 14.8$ Hz, 9.8 Hz, 5.0 Hz, H2); 3.96 (sbr, 1H, H4); 3.63 (d, 1H, $^2J = 13.1$, -CH₂C_{Ar}); 3.53 (d, 1H, $^2J = 13.1$, -CH₂C_{Ar}); 2.90-2.85 (m, 1H, H1); 2.78-2.69 (m, 1H, H1); 2.50 (sbr, 1H, -OH); 2.18 (dbr, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, H5); 2.09 (dtbr, 1H, $^2J = 12.8$ Hz, H5); 1.96 (dd, 1H, $^2J = 10.1$, $^3J = 10.1$, H3); 1.38 (ddd, 1H, $^2J = 13.1$, $^3J = 10.4$, 2.8, H3); 0.87 (s, 9H,

$-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$; 0.05 (s, 3H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 0.04 (s, 3H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

***Tert*-butyl-(3*R*,5*R*)-3-(*tert*-butyl(*dimethyl*)silyl)oxy-5-hydroxy-piperidin-1-carboxylat (**103**)**

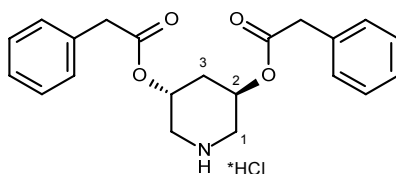


Das Piperidin **102** (7.8 g, 24.3 mmol, 1eq) wurde zusammen mit 5.8 g (26.4 mmol, 1.09 eq) Boc_2O in 180 ml MeOH gelöst und mit 400 mg Pd/C versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter einer H_2 -Atmosphäre über Nacht bei RT hydriert. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Das Boc-geschützte Piperidinderivat **103** wurde ohne weitere Aufreinigung als ein leicht gelbes Öl (7.6 g, 22.9 mmol) mit einer Ausbeute von 95 % isoliert.

Ausbeute	7.6 g (22.9 mmol, 95 %)
	leicht gelbes Öl
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 4.04 (ms, 1H, H2); 3.97 (ms, 1H, H4); 3.53-3.01 (m, 4H, H1, H5); 2.44 (sbr, 1H, OH); 1.81-1.62 (m, 2H, H3); 1.41 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 0.87 (s, 9H, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0.08 (s, 3H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 0.07 (s, 3H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.53 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 155.89 ($-\text{COO}(\text{CH}_3)_3$); 79.93 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$); 65.05 ($-\text{CHOH}$); 64.77 ($-\text{CHOSi}$); 51.26 ($-\text{NCH}_2\text{CHOH}$); 49.73 ($-\text{NCH}_2\text{CHOSi}$); 40.88 ($-\text{CHCH}_2\text{CH}$); 28.51 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$); 25.90 ($-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 18.18 (s, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.78 (s, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z (%) = 332.32 (45, $[\text{M}+\text{H}]^+$); 663.7 (11, $[2\text{M}+\text{H}]^+$); 680.62 (100, $[2\text{M}+\text{NH}_4]^+$)
HR-MS	berechnet für $(\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{NO}_4\text{Si})$: m/z = 332.225712
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 332.222617

EA	berechnet:	C: 57.97 % H: 10.03 % N: 4.22 %
	gefunden:	C: 58.03 % H: 10.00 % N: 4.25 %

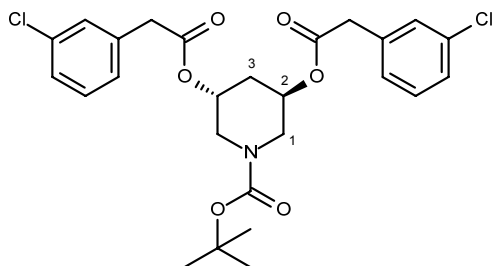
[(3*R*,5*R*)-5-(2-Phenylacetyl)oxy-3-piperidyl] 2-phenylacetat-Hydrochlorid (104b)



Zur Veresterung wurden 54.2 mg (0.25 mmol, 1 eq) des Diol **55** in 1,2 ml trockenem DCM gelöst und bei 0 °C mit 117 mg (0.75 mmol, 3 eq) Phenylacetylchlorid, 107 µl Triethylamin (0.75 mmol, 3 eq) sowie katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Aufreinigung der Verbindung **104a** erfolgte über MPLC (25 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) und ergab 80 mg (0.18 mmol, 70 %) eines gelblichen Öls, das sofort nach Anwendung der **AAV2** entschützt wurde. Das ausgefallene Hydrochlorid wurde als gelblichen Feststoff isoliert (52 mg, 0.13 mmol, 74 %).

Ausbeute	52 mg (0.13 mmol, 52 % über 2 Stufen) gelber Feststoff	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 10.21 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 7.39-7.22 (m, 10H, CH _{benzyl}); 5.27 (sbr, 2H, H2); 3.75 (d, 2H, ² J = 16.0 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.69 (d, 2H, ² J = 15.2 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 3.32-3.10 (mbr, 4H, H1); 1.98 (mbr, 2H, H3).	
MS (ES ⁺ , RT)	<i>m/z</i> (%) = 354 ([<i>M</i> +H] ⁺).	
HR-MS	berechnet für (C ₂₁ H ₂₃ NO ₄): <i>m/z</i> =	353.162708
(EI ⁺ , 70 eV)	gefunden:	353.162406
Smp.	128.5–129 °C	

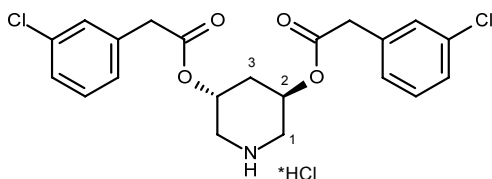
***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis[[2-(3-chlorophenyl)acetyl]oxy]piperidin-1-carboxylat (105a)**



Unter Verwendung der **AAV1** wurden 330 mg (1.52 mmol) Diol **55** mit 768 mg (4.56 mmol) 3-Chlorphenylessigsäure umgesetzt und über eine MPLC (20 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) aufgereinigt. 622 mg (1.19 mmol, 78 %) des gewünschten Produkts konnten als ein farbloses Öl isoliert werden.

Ausbeute	622 mg (1.19 mmol, 78 %)
	farbloses Öl
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.30-7.22 (m, 6H, -CH _{Ar}); 7.19-7.13 (m, 2H, -CH _{Ar}); 5.03 (sbr, 2H, H ₂); 3.65-3.35 (mbr, 8H, -CH ₂ C _{Ar} , H _{1a/b}); 2.03 (tbr, 2H, ³ <i>J</i> = 5.5 Hz, H ₃); 1.44 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).

[(3*R*,5*R*)-5-[2-(3-chlorophenyl)acetyl]oxy-3-piperidyl] 2-(3-chlorophenyl)acetat-Hydrochlorid (105b)

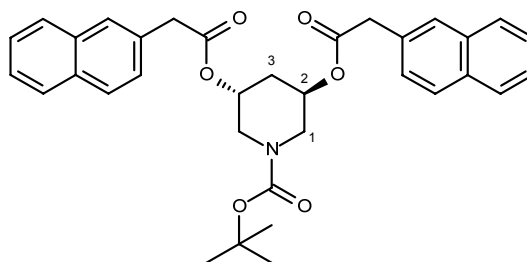


Der **AAV2** folgend wurden 522 mg (1.00 mmol) der Verbindung **105a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt in Form einer gelben, halb festen Substanz (365 mg, 0.80 mmol, 80 %) erhalten.

Ausbeute	365 mg (0.80 mmol, 80 %)
	gelbe, halb feste Substanz
¹H-NMR	δ [ppm] = 9.67 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 7.41-7.21 (m, 8H, -CH _{Ar});

(400 MHz, D ₆ -DMSO)	5.16 (m, 2H, H ₂); 3.76 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.23 (m, 2H, H _{1a}); 3.08 (dd, 2H, ² J = 12.6 Hz, ³ J = 6.9 Hz, H _{1b}); 2.03 (tbr, 2H, ³ J = 5.5 Hz, H ₃).
¹³ C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 169.8 (-C=O); 136.4 (C _q /Ar, -CH ₂ C _{Ar}); 132.8 (C _q /Ar, -C _{Ar} Cl); 130.0, 129.4, 128.3, 126.8 (4 x -CH _{Ar}); 64.9 (C2); 44.03 (C1); 39.1 (-CH ₂ C _{Ar}); 31.4 (C3).
MS (EI, 70 eV)	m/z (%) = 422 (22 [M] ⁺); 382 (22); 251 (51); 170 (14); 127.1 (89); 82 (100).
HR-MS	berechnet für (C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ Cl ₂): m/z = 422.092589
(EI, 70 eV)	gefunden: 422.089260
EA	berechnet für ½H ₂ O: C: 53.92 % H: 4.96 % N: 2.99 % gefunden: C: 53.89 % H: 5.17 % N: 3.22 %

***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis[[2-(2-naphthyl)acetyl]oxy]piperidin-1-carboxylat (106a)**

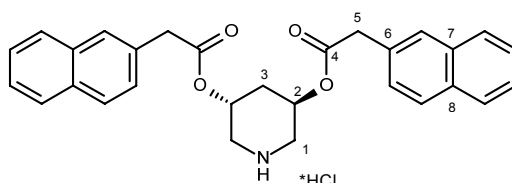


Unter Verwendung der **AAV1** wurden 330 mg (1.52 mmol) Diol **55** mit 849 mg (4.56 mmol) 2-Naphtylelessigsäure umgesetzt und über eine FC (20 % EtOAc in *iso*-Hexan) aufgereinigt. 750 mg (1.35 mmol, 90 %) des gewünschten Produkts konnten als ein farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute	750 mg (1.35 mmol, 90 %) farbloser Feststoff
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.87-7.77 (m, 6H, -CH _{Naphthyl}); 7.72 (sbr, 2H, -CH _{Naphthyl}); 7.51-7.44 (m, 4H, -CH _{Naphthyl}); 7.40 (dd, 2H, ³ J = 8.5 Hz, ⁴ J = 1.6 Hz, -CH _{Naphthyl}); 5.04 (sbr, 2H, H ₂); 3.77 (sbr, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.60 (dd, 2H, ² J = 13.5 Hz, ³ J = 3.2 Hz, H _{1a}); 3.46 (mbr, 2H, H _{1b}); 1.95 (ms, 2H, H ₃); 1.42 (s, 9H,

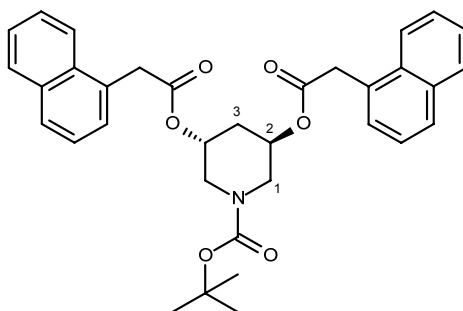
	-C(CH ₃) ₃).
Smp.	135 °C

[(3*R*,5*R*)-5-[2-(2-Naphthyl)acetyl]oxy-3-piperidyl] 2-(2-naphthyl)acetat-Hydrochlorid (106b)



Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte unter Verwendung der **AAV2**. Dazu wurden 656 mg (1.18 mmol) der Verbindung **106a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das entschützte Piperidin-Derivat **106b** als ein leicht beiges Pulver (420 mg, 0.86 mmol, 73 %) erhalten.

Ausbeute	420 mg (0.86 mmol, 73 %)
	beiges Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.71 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 7.93-7.80 (m, 8H, CH _{Naphthyl}); 7.52-7.42 (m, 6H, CH _{Naphthyl}); 5.21 (mbr, 2H, H ₂); 3.91 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.31 (mbr, 2H, H _{1a}); 3.13 (dd, 2H, ² J = 12.6 Hz, ³ J = 6.6 Hz, H _{1b}); 2.05 (tbr, 2H, ³ J = 5.5 Hz, H ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 170.0 (C ₄); 132.6 (C ₆); 131.6, 131.4 (C ₇ , C ₈); 127.5, 127.4 (2 x), 127.2, 127.1, 125.8, 125.5 (7 x -CH _{Naphthyl}); 64.6 (C ₂); 43.8 (C ₁); 39.3 (C ₅); 31.1 (C ₃).
MS (EI, 70 eV)	<i>m/z</i> (%) = 452.9 (1 [M] ⁺); 309.9 (5); 266.9 (11); 185.9 (7); 141.0 (83); 116.9 (20); 81.0 (100).
HR-MS (EI, 70 eV)	berechnet für (C ₂₉ H ₂₇ NO ₄): <i>m/z</i> = 453.194009 gefunden: 453.194015
EA	berechnet für *½H ₂ O: C: 69.80 % H: 5.86 % N: 2.81 % gefunden: C: 69.61 % H: 5.92 % N: 3.06 %
Smp.	214 °C

***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis[[2-(1-naphthyl)acetyl]oxy]piperidin-1-carboxylat (**107a**)**

Der **AAV1** folgend wurden 330 mg (1.52 mmol) Diol **55** mit 849 mg (4.56 mmol) 1-Naphtyleessigsäure umgesetzt und über eine FC (20 % EtOAc in *iso*-Hexan) aufgereinigt. 620 mg (1.25 mmol, 82 %) des gewünschten Produkts **107a** konnten als ein gelber Feststoff isoliert werden.

Ausbeute

620 mg (1.25 mmol, 82 %)

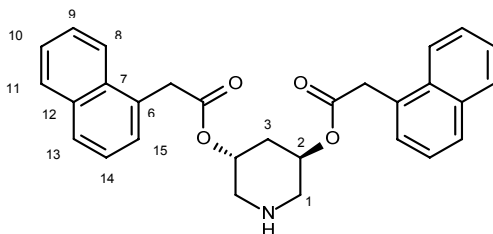
leicht gelblicher Feststoff

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 7.97 (d, 2H, $^3J = 8.6$ Hz, -CH_{Naphthyl}); 7.85 (d, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, -CH_{Naphthyl}); 7.79 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, -CH_{Naphthyl}); 7.54-7.37 (m, 8H, -CH_{Naphthyl}); 5.01 (mbr, 2H, H2); 4.04 (sbr, 4H, -CH₂C_{Ar}); 3.61-3.31 (m, 4H, H1); 1.87 (t, 2H, $^3J = 5.5$ Hz, H3); 1.46 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

Smp.

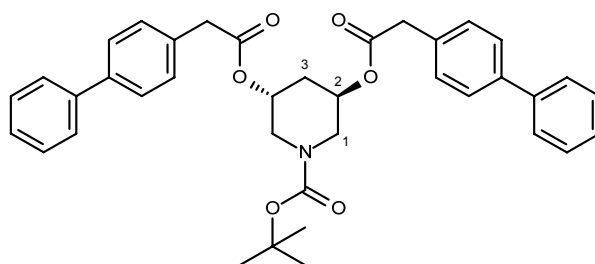
140 °C

[(3*R*,5*R*)-5-[2-(1-Naphthyl)acetyl]oxy-3-piperidyl] 2-(1-naphthyl)acetat (107b**)**

Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte unter Verwendung der **AAV2**. Dazu wurden 400 mg (0.75 mmol) der Verbindung **107a** mit 2 ml 2 M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt nach einer MPLC (5 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) als ein leicht gelbes Harz (200 mg, 0.44 mmol, 60 %) erhalten.

Ausbeute	200 mg (0.44 mmol, 60 %)
	leicht gelbes Harz
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 7.98-7.91 (m, 4H, -CH _{Naphthyl}); 7.85 (dd, 2H, ³ <i>J</i> = 6.9 Hz, 2.8 Hz, -CH _{Naphthyl}); 7.50 (ms, 4H, -CH _{Naphthyl}); 7.53-7.42 (m, 4H, -CH _{Naphthyl}); 4.87 (m, 2H, H ₂); 4.13 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 2.80 (dd, 2H, ² <i>J</i> = 13.2 Hz, ³ <i>J</i> = 3.0 Hz, H _{1a}); 2.57 (dd, 2H, ² <i>J</i> = 13.2 Hz, ³ <i>J</i> = 6.2 Hz, H _{1b}); 1.86 (tbr, 2H, ³ <i>J</i> = 5.5 Hz, H ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 170.6 (-CO ₂); 133.3 (C ₆); 131.7, 131.0 (C ₇ , C ₁₂); 128.4, 128.0, 127.6, 126.2, 125.7, 125.5, 123.9 (7 x -CH _{Naphthyl}); 68.9 (C ₂ /C ₄); 48.1 (C ₁ /C ₅); 38.2 (-CH ₂ C _{Ar}); 33.6 (C ₃).
MS (ES⁺, RT)	<i>m/z</i> (%) = 454.16 (100 [<i>M</i> +H] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₂₉ H ₂₈ NO ₄): <i>m/z</i> = 454.201834
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 454.200154
EA	berechnet für * ¹ / ₄ H ₂ O: C: 76.04 % H: 6.05 % N: 3.06 %
	gefunden: C: 76.20 % H: 6.13 % N: 3.12 %

***Tert*-butyl-(3*R*,5*R*)-3,5-bis[[2-(4-phenylphenyl)acetyl]oxy]piperidin-1-carboxylat (108a)**

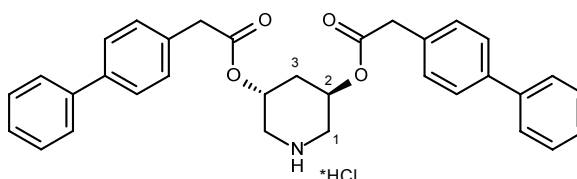


Die Durchführung der **AAV1** mit 330 mg (1.52 mmol) Diol **55** und 955 mg (4.56 mmol) 4-Biphenylessigsäure ergab nach Aufreinigung über MPLC (25 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) 848 mg (1.40 mmol, 93 %) des gewünschten Produkts.

Ausbeute	848mg (1.4mmol, 93 %)
	farbloses Pulver

¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.93-7.21 (m, 18H, -CH _{Ar}); 5.09 (sbr, 2H, H ₂); 3.65 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 4.23-3.48 (mbr, 4H, H _{1a/b}); 2.05 (mbr, 2H, H ₃); 1.42 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).
Smp.	97 °C

[(3*R*,5*R*)-5-[2-(4-Phenylphenyl)acetyl]oxy-3-piperidyl]2-(4-phenylphenyl)acetat-Hydrochlorid (108b)

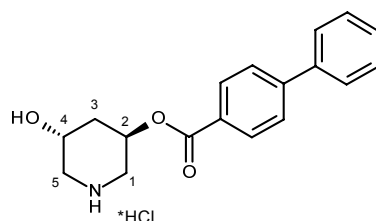


Die Abspaltung der Boc-Gruppe erfolgte unter Verwendung der **AAV2**. Dazu wurden 738 mg (1.22 mmol) der Verbindung **108a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt nach einer MPLC (10 % MeOH in DCM) als ein farbloser Feststoff (100 mg, 0.19 mmol, 15 %) erhalten.

Ausbeute	100 mg (0.19 mmol, 15 %) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.40 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 7.69-7.56 (m, 8H, 8 x -CH _{Ar}); 7.48-7.42 (m, 4H, 4 x -CH _{Ar}); 7.41-7.32 (m, 6H, 6 x -CH _{Ar}); 5.17 (m, 2H, H ₂); 3.77 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.28 (m, 2H, H _{1a}); 3.10 (dd, 2H, ² J = 12.8 Hz, ³ J = 6.9 Hz, H _{1b}); 2.03 (t, 2H, ³ J = 5.7 Hz, H ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 170.2 (-C=O); 139.8, 138.7, 133.2 (3 x C _{q/Ar}); 130.0, 128.9, 127.3, 126.6, 126.5 (5 x -CH _{Ar}); 64.9 (C ₂); 44.2 (C ₁); 39.7 (-CH ₂ C _{Ar}); 31.5 (C ₃).
MS (EI, 70 eV)	m/z (%) = 505 (9 [M] ⁺); 293 (9); 212 (16); 194 (13); 167 (72); 81 (100).
HR-MS (EI, 70 eV)	berechnet für (C ₃₃ H ₃₁ NO ₄): m/z = 505.225309 gefunden: 505.224077
EA	berechnet: C: 73.12 % H: 5.95 % N: 2.58 %

	gefunden:	C: 73.01 % H: 6.19 % N: 2.57 %
Smp.	196 °C	

[(3*R*,5*R*)-5-Hydroxy-3-piperidyl] 4-phenylbenzoat-Hydrochlorid (109b**)**

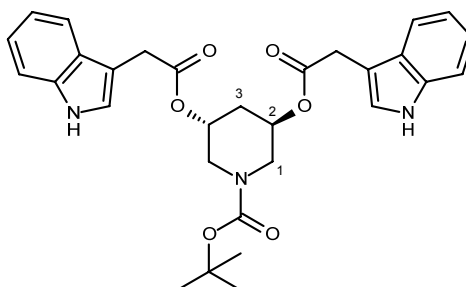


Unter Verwendung der **AAV1** wurden 325 mg (1.50 mmol) Diol **55** mit 892 mg (4.50 mmol) Biphenyl-4-carbonsäure umgesetzt und über eine MPLC (20 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) aufgereinigt. 175 mg (0.44 mmol, 30 %) der einfach substituierten Verbindung **109a** konnte als ein farbloser Feststoff isoliert werden. In Anlehnung an **AAV2** wurden 165 mg (0.42 mmol) der Verbindung **109a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt in Form eines farblosen Feststoffs (98 mg, 0.30 mmol, 71 %) isoliert.

Ausbeute	98 mg (0.30 mmol, 21 % über 2 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.41 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 8.17 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.7 Hz, -CH _{Ar}); 7.83 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -CH _{Ar}); 7.75 (m, 2H, 2 x -CH _{Ar}); 7.53-7.38 (m, 3H, 3 x -CH _{Ar}); 5.54 (d, 1H, ³ <i>J</i> = 4.6 Hz, -OH); 5.43 (m, 1H, H2); 4.09 (ms, 1H, H4); 3.28 (mbr, 2H, H1 _a , H5 _a)*; 3.21 (dd, 1H ² <i>J</i> = 12.1 Hz, ³ <i>J</i> = 3.2 Hz, H1 _b)*; 2.79 (dd, 1H, ² <i>J</i> = 11.9 Hz, ³ <i>J</i> = 8.5 Hz, H5 _b)*; 2.08 (ddd, ² <i>J</i> = 13.6 Hz, ³ <i>J</i> = 4.8 Hz, ³ <i>J</i> = 4.5 Hz, H3 _a); 1.88 (ddd, ² <i>J</i> = 13.3 Hz, ³ <i>J</i> = 9.4 Hz, ³ <i>J</i> = 3.5 Hz, H3 _b).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 164.5 (-C=O); 144.9 (C _{q/Ar} , -COC _{Ar}); 138.8 (C _{q/Ar}); 130.4, 129.0, 128.4 (3 x -CH _{Ar}); 128.1 (C _{q/Ar}); 127.0, 126.7 (2 x -CH _{Ar}); 66.2 (C2); 60.2 (C4); 47.8 (C1); 44.6 (C5); 35.0 (C3).
MS (EI, 70 eV)	<i>m/z</i> (%) = 298 (5 [<i>M</i>] ⁺); 198 (16); 181 (55); 152 (61); 99 (100);

	81 (17).
HR-MS	berechnet für (C ₁₈ H ₂₀ NO ₃): m/z = 298.144319
(EI, 70 eV)	gefunden: 298.145176
EA	berechnet für * $\frac{1}{4}$ H ₂ O: C: 63.90 % H: 6.11 % N: 4.14 %
	gefunden: C: 64.01 % H: 6.30 % N: 4.17 %
Smp.	270 °C (Zersetzung)

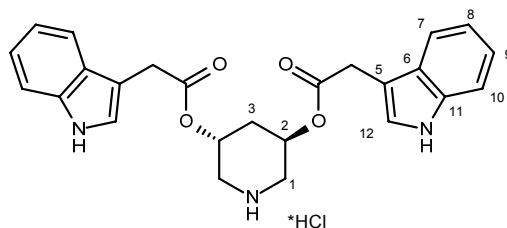
***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis[[2-(1*H*-indol-3-yl)acetyl]oxy]piperidin-1-carboxylat (110a)**



Unter Verwendung der **AAV1** wurden 330 mg (1.52 mmol) Diol **55** mit 788 mg (4.56 mmol) 3-Indolessigsäure umgesetzt und über eine MPLC (20 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) aufgereinigt. 420 mg (0.79 mmol, 52 %) des gewünschten Produkts **110a** konnten als ein beiger Feststoff isoliert werden.

Ausbeute	420 mg (0.79 mmol, 52 %) beiger Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 8.11 (sbr, 2H, -NH); 7.60 (d, 2H, 3J = 8.5 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 7.34 (d, 2H, 3J = 8.0 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 7.21-7.11 (m, 6H, 4 x -CH _{Ar} , 2 x -CH=C); 5.04 (sbr, 2H, H ₂); 3.75 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.65-3.55 (mbr, 2H, H _{1a}); 3.46 (dd, 2H, 2J = 13.5 Hz, 3J = 6.6 Hz, H _{1b}); 1.93 (mbr, 2H, H ₃); 1.43 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).
Smp.	98 °C

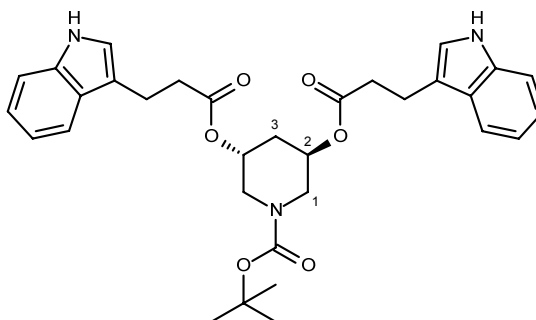
[(3*R*,5*R*)-5-[2-(1*H*-indol-3-yl)acetyl]oxy-3-piperidyl] 2-(1*H*-indol-3-yl)acetat-Hydrochlorid (110b**)**



Der **AAV2** folgend wurden 320 mg (0.60 mmol) der Verbindung **110a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt in Form weinroter Kristalle (245 mg, 0.52 mmol, 87 %) isoliert.

Ausbeute	245 mg (0.52 mmol, 87 %)
	weinrote Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 10.97 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 9.61 (sbr, 2H, -NH); 7.52 (d, 2H, ³ <i>J</i> = 7.8 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 7.36 (d, 2H, ³ <i>J</i> = 8.0 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 7.27 (d, 2H, ⁴ <i>J</i> = 2.3 Hz, 2 x -CH=C); 7.07 (dt, 2H, ³ <i>J</i> = 6.9 Hz, ⁴ <i>J</i> = 1.1 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 6.97 (t, 2H, ³ <i>J</i> = 6.9 Hz, ⁴ <i>J</i> = 0.9 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 5.19 (ms, 2H, H ₂); 3.80 (s, 4H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.30 (dbr, 2H, ² <i>J</i> = 10.1 Hz, H _{1a}); 3.12 (dd, 2H, ² <i>J</i> = 12.5 Hz, ³ <i>J</i> = 6.8 Hz, H _{1b}); 2.00 (t, 2H, ³ <i>J</i> = 5.3 Hz, H ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 170.6 (-C=O); 136.0 (C _{q/Ar} , C11); 127.0 (C _{q/Ar} , C6); 124.1 (CH _{Ar} , C12); 121.0 (CH _{Ar} , C7); 118.4 (CH _{Ar} , C8, C9); 111.4 (CH _{Ar} , C10); 106.5 (C _{q/Ar} , C5); 64.6 (C2); 44.2 (C1); 31.5 (C3); 30.6 (C4).
MS (EI, 70 eV)	<i>m/z</i> (%) = 431 (15 [<i>M</i>] ⁺); 257 (8); 175 (8); 157 (21); 130 (100); 81 (41).
HR-MS	berechnet für (C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₄): <i>m/z</i> = 431.184507
(EI, 70 eV)	gefunden: 431.182037
EA	berechnet für *1H ₂ O: C: 61.39 % H: 5.81 % N: 8.65 %
	gefunden: C: 61.39 % H: 5.84 % N: 8.61 %
Smp.	124 °C

***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis[3-(1*H*-indol-3-yl)propanoyloxy]piperidin-1-carboxylat (111a)**



Der **AAV1** folgend wurden 330 mg (1.52 mmol) Diol **55** mit 851 mg (4.56 mmol) Indol-3-propansäure umgesetzt und über eine MPLC (25 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) aufgereinigt. 452 mg (0.81 mmol, 53 %) des gewünschten Produkts **111a** konnten als ein farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute

420 mg (0.79 mmol, 52 %)

farbloser Feststoff

¹H-NMR

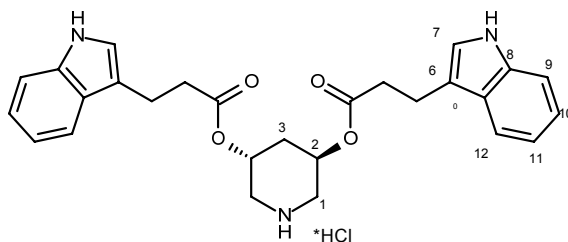
(400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.02 (sbr, 2H, -NH); 7.61 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, 2 x -CH_{Ar}); 7.33 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, 2 x -CH_{Ar}); 7.20 (t, 2H, $^3J = 6.9$ Hz, 2 x -CH_{Ar}); 7.12 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, 2 x -CH_{Ar}); 7.01 (sbr, 2H, 2 x -CH=C); 5.00 (sbr, 2H, H₂); 3.55 (dd, 2H, $^2J = 15.2$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, H_{1a}); 3.40 (dd, 2H, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 6.6$ Hz, H_{1b}); 3.10 (t, 4H, $^3J = 7.3$ Hz, -C(=O)CH₂); 2.73 (t, 4H, $^3J = 6.1$ Hz, -C(=O)CH₂CH₂); 1.82 (mbr, 2H, H₃); 1.44 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

Smp.

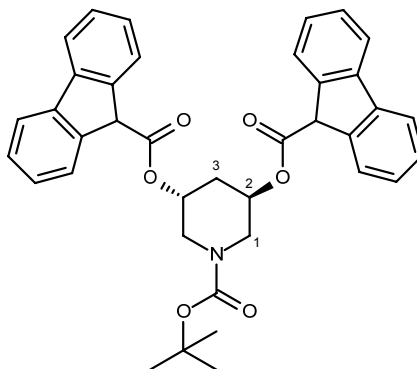
85 °C

[(3*R*,5*R*)-5-[3-(1*H*-indol-3-yl)propanoyloxy]-3-piperidyl] 3-(1*H*-indol-3-yl)propanoat-Hydrochlorid (111b**)**



In Anlehnung an **AAV2** wurden 352 mg (0.63 mmol) der Verbindung **111a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt in Form eines grauen Pulvers (240 mg, 0.48 mmol, 77 %) isoliert.

Ausbeute	240 mg (0.48 mmol, 77 %) graues Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 10.82 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 9.58 (sbr, 2H, -NH); 7.53 (d, 2H, ³ J = 7.8 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 7.34 (d, 2H, ³ J = 8.0 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 7.14 (d, 2H, ⁴ J = 2.3 Hz, 2 x -CH=C); 7.06 (dt, 2H, ³ J = 6.9 Hz, ⁴ J = 0.9 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 6.97 (dt, 2H, ³ J = 7.8 Hz, ⁴ J = 0.9 Hz, 2 x -CH _{Ar}); 5.12 (ms, 2H, H ₂); 3.23 (m, 2H, H _{1a}); 3.06 (m, 2H, H _{1b}); 3.00 (t, 4H, ³ J = 7.3 Hz, -C(=O)CH ₂); 2.73 (t, 4H, ³ J = 8.0 Hz, -C(=O)CH ₂ CH ₂); 1.95 (t, 2H, ³ J = 5.5 Hz, H ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 171.6 (-C=O); 136.2 (C _{q/Ar} , C8); 126.8 (C _{q/Ar} , C13); 122.3 (CH _{Ar} , C7); 120.9 (CH _{Ar} , C12); 118.2, 118.1 (CH _{Ar/q} , C10, C11); 112.8 (C _{q/Ar} , C6); 111.3 (CH _{Ar} , C9); 64.2 (C2); 44.2 (C1); 34.4 (C4); 31.4 (C3); 20.1 (C5).
MS (EI, 70 eV)	<i>m/z</i> (%) = 459 (18 [M] ⁺); 306 (7); 270 (7); 189 (26); 143 (17); 130 (100); 81 (90).
HR-MS (EI, 70 eV)	berechnet für (C ₂₇ H ₂₉ N ₃ O ₄): <i>m/z</i> = 459.215807 gefunden: 459.213864
EA	berechnet für *1½H ₂ O: C: 62.00 % H: 6.36 % N: 8.03 % gefunden: C: 61.86 % H: 6.35 % N: 7.97 %
Smp.	118 °C

***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis(9*H*-fluoren-9-carboxyloxy)piperidin-1-carboxylat (112a)**

Der **AAV1** folgend wurden 330 mg (1.52 mmol) Diol **55** mit 959 mg (4.56 mmol) Fluoren-9-carbonsäure umgesetzt und über eine MPLC (25 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) aufgereinigt. 824 mg (1.37 mmol, 91 %) des gewünschten Produkts konnten als ein farbloser Feststoff isoliert werden.

Ausbeute

824mg (1.37mmol, 91 %)

farbloses Pulver

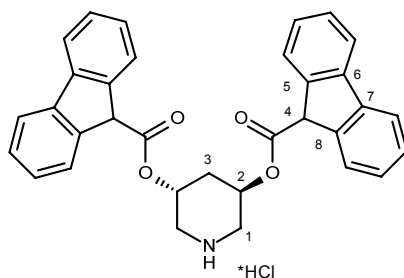
¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 7.75 (d, 4H, $^3J = 7.6$ Hz, 4 x -CH_{Ar}); 7.72-7.60 (m, 4H, -CH_{Ar}); 7.42 (t, 4H, $^3J = 7.6$ Hz, 4 x -CH_{Ar}); 7.38-7.29 (m, 4H, 4 x -CH_{Ar}); 5.14 (sbr, 2H, H₂); 4.84 (s, 2H, -C(=O)CH); 3.65 (dbr, 2H, $^2J = 12.8$ Hz, H_{1a}); 3.55 (mbr, 2H, H_{1b}); 2.05 (mbr, 2H, H₃); 1.41 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

Smp.

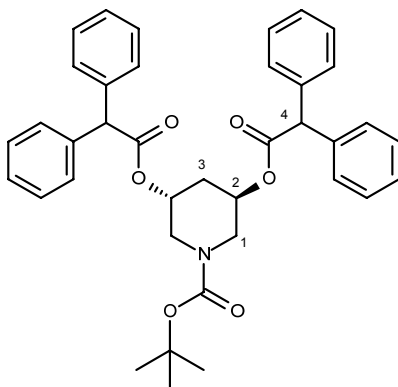
142 °C

[(3*R*,5*R*)-5-(9*H*-Fluoren-9-carboxyloxy)-3-piperidyl] 9*H*-fluoren-9-carboxylat-Hydrochlorid (112b)



Der **AAV2** folgend wurden 714 mg (1.19 mmol) der Verbindung **112a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt in Form eines leicht gelben Feststoffs (530 mg, 0.96 mmol, 83 %) gewonnen.

Ausbeute	530 mg (0.96 mmol, 83 %)
	leicht gelber Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.77 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 7.92 (d, 4H, ³ <i>J</i> = 7.3 Hz, 4 x -CH _{Ar}); 7.75 (dt, 4H, ⁴ <i>J</i> = 0.7 Hz, ³ <i>J</i> = 7.9 Hz, 4 x -CH _{Ar}); 7.50-7.42 (m, 4H, 4 x -CH _{Ar}); 7.37 (ms, 4H, 4 x -CH _{Ar}); 5.37 (sbr, 2H, H ₂); 5.18 (s, 2H, -C(=O)CH); 3.41 (dd, 2H, ² <i>J</i> = 12.7 Hz, ³ <i>J</i> = 3.2 Hz, H _{1a}); 3.31 (dd, 2H, ² <i>J</i> = 12.7 Hz, ³ <i>J</i> = 6.9 Hz, H _{1b}); 2.17 (tbr, 2H, ³ <i>J</i> = 5.7 Hz, H ₃).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 169.2 (-C(=O) ₂ (OCOCH) ₃); 140.83, 140.75 (C ₅ , 8); 140.3, 140.2 (C ₆ , C ₇); 128.13, 128.1, 127.39, 127.35, 126.0, 125.6, 120.2, 120.1 (8 x -CH _{Ar}); 65.6 (C ₂); 52.6 (C ₄); 44.0 (C ₁); 31.4 (C ₃).
MS (EI, 70 eV)	<i>m/z</i> (%) = 500.9 (8 [M] ⁺); 290.9 (11); 191.9 (9); 164.9 (100); 81.0 (79).
HR-MS	berechnet für (C ₃₃ H ₂₇ NO ₄): <i>m/z</i> = 501.194009
(EI, 70 eV)	gefunden: 501.194740
EA	berechnet: C: 73.67 % H: 5.25 % N: 2.60 % gefunden: C: 73.57 % H: 5.54 % N: 2.58 %
Smp.	216 °C

***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis[(2,2-diphenylacetyl)oxy]piperidin-1-carboxylat (113a)**

Der AAV1 folgend wurden 325 mg (1.50 mmol) Diol **55** mit 955 mg (4.50 mmol) Diphenylessigsäure umgesetzt und über eine MPLC (25 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) aufgereinigt. 791 mg (1.31 mmol, 87 %) des gewünschten Produkts konnten als ein farbloses Öl isoliert werden.

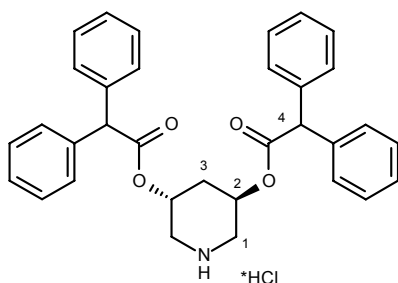
Ausbeute

791 mg (1.31 mmol, 87 %)

farbloses Öl

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃)

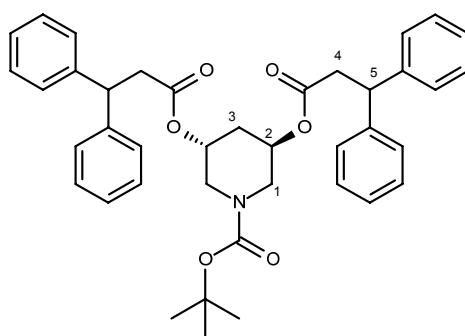
δ [ppm] = 7.48-7.19 (m, 20H, -CH_{Ar}); 5.11-4.91 (m, 4H, H2, H4); 3.80-3.20 (mbr, 4H, H1_{a/b}); 2.09-1.82 (mbr, 2H, H3); 1.41 (mbr, 9H, -C(CH₃)₃).

[(3*R*,5*R*)-5-(2,2-Diphenylacetyl)oxy-3-piperidyl] 2,2-diphenylacetat-Hydrochlorid (113b)

In Anlehnung an **AAV2** wurden 691 mg (1.14 mmol) der Verbindung **113a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt in Form eines leicht gelben Feststoffs (540 mg, 1.00 mmol, 87 %) isoliert.

Ausbeute	540 mg (1.00 mmol, 88 %)
	leicht gelber Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.56 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 7.38-7.21 (m, 20H, CH _{Ar}); 5.26 (s, 2H, H4); 5.14 (ms, 2H, H2), 3.25 (dd, 2H, ² J = 12.7 Hz, ³ J = 3.1 Hz, H1 _a); 3.05 (dd, 2H, ² J = 12.7 Hz, ³ J = 6.7 Hz, H1 _b); 1.95 (t, 2H, ³ J = 5.6 Hz, H3).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 170.9 (-C=O); 138.58, 138.55 (C _{q/Ar}); 128.7, 128.6, 128.55, 128.4, 128.2, 127.1 (5 x -CH _{Ar}); 65.2 (C2); 55.4 (C4); 44.1 (C1); 31.0 (C3).
MS (EI ⁺ , 70 eV)	m/z (%) = 506 (13 [M] ⁺); 293 (53); 212 (14); 168 (82); 82 (100).
HR-MS (EI, 70 eV)	berechnet für (C ₃₃ H ₃₂ NO ₄): m/z = 506.233134 gefunden: 506.229976
EA	berechnet für *½H ₂ O: C: 71.92 % H: 6.04 % N: 2.54 % gefunden: C: 71.68 % H: 6.13 % N: 2.63 %
Smp.	125 °C

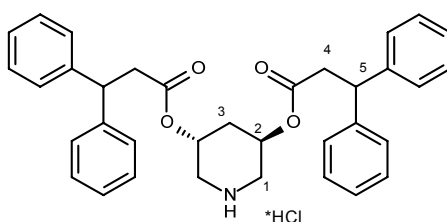
***Tert*-butyl (3*R*,5*R*)-3,5-bis(3,3-diphenylpropanoyloxy)piperidin-1-carboxylat (**114a**)**



Die Durchführung der **AAV1** mit 325 mg (1.50 mmol) Diol **55** und 1.02 g (4.50 mmol) 3,3-Diphenylpropansäure ergab nach Aufreinigung über MPLC (25 % EtOAc in *cyclo*-Hexan) 296 mg (0.47 mmol, 31 %) des gewünschten Produkts.

Ausbeute	296 mg (0.47 mmol, 31 %)
	farbloses Öl
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.28-7.12 (m, 20H, -CH _{Ar}); 4.79 (mbr, 2H, H2); 4.48 (t, 2H, ³ J = 8.2 Hz, H5); 3.41-2.99 (mbr, 8H, C4, H1 _{a/b}); 1.51 (t, 2H, ³ J = 5.5 Hz, H3); 1.41 (s, 9H, -C(CH ₃) ₃).

[(3*R*,5*R*)-5-(3,3-diphenylpropanoyloxy)-3-piperidyl] 3,3-diphenylpropanoat-Hydrochlorid (114b)

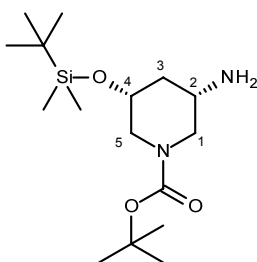


Der **AAV2** folgend wurden 256 mg (0.4 mmol) der Verbindung **114a** mit 2 ml 2M HCl-Lösung in Et₂O versetzt und das gewünschte Produkt in Form eines beigen Pulvers (221 mg, 0.39 mmol, 97 %) erhalten.

Ausbeute	221 mg (0.39 mmol, 97 %)
	beiges Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.38 (sbr, 2H, -NH ₂ ⁺); 7.33-7.11 (m, 20H, 20 x -CH _{Ar}); 4.96 (m, 2H, H2), 4.48 (t, 2H, ³ J = 8.0 Hz, H5); 3.22 (m, 6H, H4, H1 _a); 2.87 (dd, 2H, ² J = 12.5 Hz, ³ J = 6.5 Hz, H1 _b); 1.60 (t, 2H, ³ J = 5.5 Hz, H3).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 169.7 (-C=O); 143.3 (-C _{q/Ar}); 128.2, 127.2, 126.1 (3 x -CH _{Ar}); 63.9 (C2); 46.1 (C5); 43.9 (C1); 38.9 (C4); 31.0 (C3).
MS (EI ⁺ , 70 eV)	m/z (%) = 534 (1 [M] ⁺); 307 (12); 167 (53); 81 (100).
HR-MS (EI, 70 eV)	berechnet für (C ₃₅ H ₃₆ NO ₄): m/z = 534.264434 gefunden: 534.261246
EA	berechnet für *H ₂ O: C: 71.48 % H: 6.51 % N: 2.38 %

Smp.	gefunden:	C: 71.13 % H: 6.39 % N: 2.28 %
	207-209 °C	

***Tert*-butyl (3*S*,5*R*)-3-amino-5-(*tert*-butyl(dimethylsilyl)oxy)-piperidin-1-carboxylat (116)**

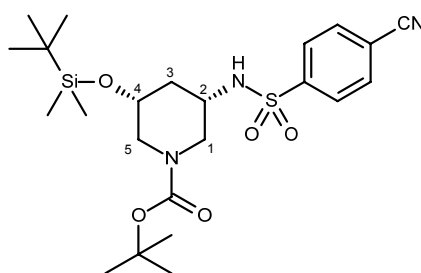


In einem Dreihalskolben unter Argon wurden 20.5 g (78.0 mmol, 2.8 eq) TPP in 285 ml trockenem THF gelöst und im Eis-Salzbad auf -15 °C runtergeköhlt. Unter sorgfältiger Temperaturkontrolle ($T \leq -10$ °C) wurden 4.8 ml DEAD (30.7 mmol, 1.1 eq) zum Ansatz getropft. Nach 30 min wurden 9.2 g (27.8 mmol, 1 eq) des Alkohols **103** in einer Portion zugegeben, wobei auch hier die Temperatur unter -10 °C gehalten wurde. Nach weiteren 30 min wurden 7.8 ml (36.2 mmol, 1.3 eq) DPPA tropfenweise zugegeben ($T \leq -10$ °C), das Reaktionsgemisch im Eisbad langsam auf RT aufgewärmt und für 12 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurden 35 ml 25%ige Ammoniaklösung für die Hydrolyse hinzugefügt und für 12 h zur Reaktion gebracht. Zuletzt wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der klebrige Rückstand sofort auf Kieselgel aufgezogen. Das gewünschte Amin **116** konnte über eine FC (DCM:MeOH 9:1 +0,1 % NH_3/MeOH) als ein farbloses Öl (6.8 g, 20.6 mmol, 76%) isoliert werden.

Ausbeute	6.8 g (20.6 mmol, 76 %)
	farbloses Öl
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$)	δ [ppm] = 3.83 (ms, 2H); 3.52 (ms, 1H); 3.30 (sbr, 1H); 2.55 (ms, 1H); 2.20-2.46 (sbr, 2H); 2.00 (ms, 1H); 1.72-1.59 (sbr, 1H); 1.38 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.09 (m, 1H); 0.87 (s, 9H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); 0.08 (s, 3H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 0.07 (s, 3H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.53 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$) Rotamere	δ [ppm] = 154.7 ($-\text{COO}(\text{CH}_3)_3$); 79.7 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$); 66.6 (C4); 51.5 (C5); 51.0 (C1); 46.8 (C2); 43.0 (C3); 28.4 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$);

	25.8 (-SiC(CH ₃) ₃); 18.1 (-SiC(CH ₃) ₃); -4.9 (-Si(CH ₃) ₂).
MS (ES+, RT)	m/z (%) = 331.34 (60, [M+H] ⁺); 661.61 (100, [2M+H] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₁₆ H ₃₅ N ₂ O ₃ Si): m/z = 331.241697
(ES+, RT)	gefunden: 331.243473
EA	berechnet: C: 58.14 % H: 10.37 % N: 8.48 %
	gefunden: C: 57.62 % H: 10.23 % N: 8.32 %

***Tert*-butyl (3*R*,5*S*)-3-(*tert*-butyl(dimethylsilyl)oxy)-5-[(4-cyanophenyl)sulfonylamino]piperidin-1-carboxylat (**117**)**

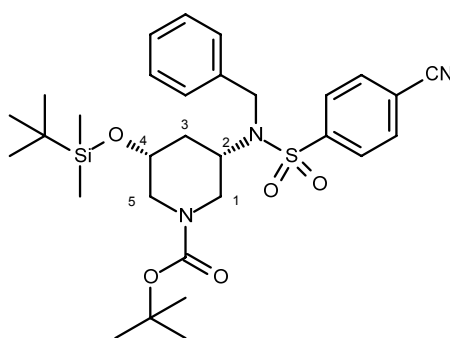


Nach **AAV3** wurden 2.7 g (8.17 mmol) der Verbindung **116** mit 1.7 ml DIPEA (9.80 mmol, 1.2 eq) und 1.8 g 4-Cyanobenzylsulfonylchlorid (8.99 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. Das gewünschte Produkt wurde mittels MPLC (*iso*-Hexan:TBME 3:2) aufgereinigt und als farblose, halbfeste Substanz (3.3 g, 6.66 mmol 82 %) erhalten.

Ausbeute	3.3 g (6.66 mmol, 82%) farblose, halbfeste Substanz
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.13 (sbr, 1H, -NH <u>S</u> O ₂); 8.10 (dbr, 2H; ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz; -SO ₂ CCH <u>H</u>); 7.99 (d, 2H; ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.7 Hz; -SO ₂ CCHCH <u>H</u>); 3.80 (mbr, 1H, H4); 3.45 (mbr, 1H, H2); 3.08 (mbr, 1H, H5 _a); 2.38 (sbr, 2H, H1 _{a/b}); 1.70 (sbr, 1H, H5 _b); 1.34 (sbr, 9H, -OC(CH ₃) ₃); 1.18 (mbr, 2H, C3); 0.80 (sbr, 9H, -SiC(CH ₃) ₃); -0.01, -0.03 (sbr, 6H, -Si(CH ₃) ₂).
¹³C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 153.4 (-CO ₂ C(CH ₃) ₃); 145.7 (-SO ₂ C <u>A</u> r); 133.4 (-C <u>H</u> CCN); 127.1 (-SO ₂ CCH); 117.6 (-C <u>A</u> rCN); 114.9 (-C <u>N</u>); 79.1 (-OC(CH ₃) ₃); 65.6 (C4); 47.9 (C2); 39.9 (C1, C5); 27.8 (-OC(CH ₃) ₃); 25.5 (-SiC(CH ₃) ₃); 17.6 (-SiC(CH ₃) ₃); -5.1

	(-Si(CH ₃) ₂).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z (%) = 496.40 [M+H] ⁺ ; 513.34 [M+NH ₄] ⁺ ; 518.37 [M+Na] ⁺ .
HR-MS	berechnet für (C ₂₃ H ₃₈ N ₃ O ₅ SSi): m/z = 496.230147
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 496.233455
	berechnet für (C ₂₃ H ₄₁ N ₄ O ₅ Ssi) m/z =: 513.256696
	gefunden: 513.259064

***Tert*-butyl (3*S*,5*R*)-3-[benzyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]-5-(*tert*-butyl (dimethyl)silyl)oxy-piperidin-1-carboxylat (**118**)**

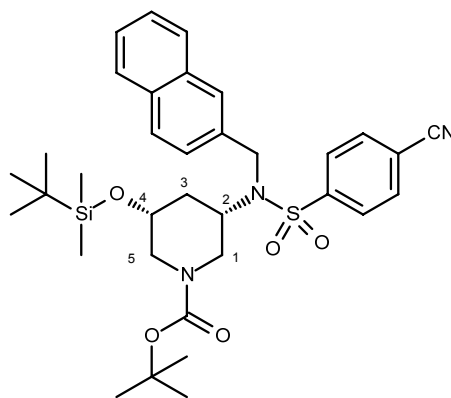


Mittels **AAV4** wurden 1.1 g Verbindung **117** (2.22 mmol, 1 eq) mit 1.08 g Cs₂CO₃ (3.33 mmol, 1.5 eq) und 316 µl Benzylbromid (2.66 mmol, 1.2 eq) umgesetzt. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte mittels MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 8:1) und Verbindung **118** wurde als farbloser Feststoff (1.2 g, 2.03 mmol, 93%) erhalten.

Ausbeute	1.2 g (2.03 mmol, 93%) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.88 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.7 Hz, -SO ₂ CCH); 7.77 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.34-7.26 (sbr, 5H, 5 x -CH _{Ar}); 4.55 (d, 1H, ² <i>J</i> = 15.3 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.28 (d, 1H, ² <i>J</i> = 15.8 Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.10-3.62 (m, 3H, H ₂ , H ₄ , H _{1a})*; 3.47 (ms, 1H, H _{1b})*; 2.36 (t, 1H, ² <i>J</i> = 15.3 Hz, H _{5a})*; 2.30-2.14 (sbr, 1H, H _{5b})*; 1.81-1.49 (m, 2H, H ₃)*; 1.42 (s, 9H, -COOC(CH ₃) ₃); 0.83 (s, 9H, -SiC(CH ₃) ₃); 0.02 (s, 3H, -Si(CH ₃) ₂); -0.01 (s, 3H, -Si(CH ₃) ₂).

^{13}C-NMR APT	δ [ppm] = 154.2 ($-\text{COO}(\text{CH}_3)_3$); 145.2 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 136.6 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 132.9 ($-\text{CHCCN}$); 128.7, 128.0, 127.8, 127.4 (4 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 117.2 ($-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CN}$); 116.2 ($-\text{CN}$); 80.3 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$); 66.8, 66.7 (C2, C4); 53.8, 53.6, 53.2 (C1, C5, C3); 48.5 ($-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 28.2 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$); 25.7 ($-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 18.0 ($-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.8, -4.9 ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).
Rotamere (100.53 MHz, CDCl_3)	
MS (ES+, RT)	m/z = 586.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); 603.3 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)
HR-MS (ES+, RT)	berechnet für $(\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_5\text{Ssi})$: m/z = 586.277097 gefunden: 586.280328
EA	berechnet: C: 61.51 % H: 7.40 % N: 7.17 % gefunden: C: 61.44 % H: 7.50 % N: 7.11 %
Smp.	132.5 °C

***Tert*-butyl (3*R*,5*S*)-3-(*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy-5-[(4-cyanophenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]piperidin-1-carboxylat (**119**)**

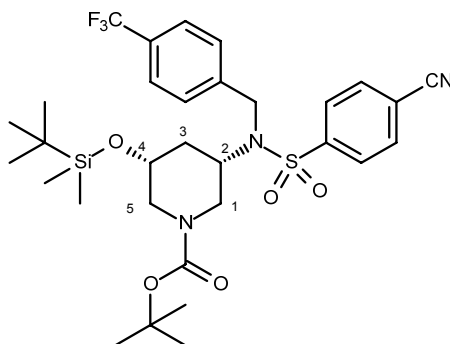


Analog **AAV4** wurden 1.5 g (3.03 mmol) der Verbindung **117** mit 1.48 g (4.54 mmol) Cs_2CO_3 und 803 mg (3.63 mmol) 2-(Brommethyl)naphthalen umgesetzt. Die Aufreinigung des Produktes erfolgte mittels MPLC (*iso*-Hexan:TBME 5:1) und Verbindung **119** wurde als farbloser Feststoff (1.6 g, 82%) erhalten.

Ausbeute	1.6 g (2.52 mmol, 82 %) farblose Feststoff
^1H-NMR	δ [ppm] = 8.15 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\text{CCH}$); 8.09 (d,

(400 MHz, D ₆ -DMSO)	2H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.94-7.84 (m, 4H, 4 x -CH _{Naphthyl}); 7.56-7.48 (m, 3H, 3 x -CH _{Naphthyl}); 4.79 (dbr, 1H, $^2J = 15.1$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.68-4.52 (sbr, 1H, -CH ₂ C _{Ar}); 3.88-3.68 (m, 2H, H2, H4, H1)*; 3.68-3.52 (m, 1H, H2, H4, H1)*; 3.47 (ms, 1H, H2, H4, H1)*, 2.43-2.20 (sbr, 2H, H5)*; 1.61-1.49 (m, 2H, H3)*; 1.31 (sbr, 9H, -COOC(CH ₃) ₃); 0.76 (s, 9H, -SiC(CH ₃) ₃); -0.05 (s, 3H, -Si(CH ₃) ₂); -0.09 (s, 3H, -Si(CH ₃) ₂).
¹³ C-NMR APT (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 153.4 (-COOC(CH ₃) ₃); 144.4 (-SO ₂ C _{Ar}); 136.1 (-NCH ₂ C _{Ar}); 133.6 (-SO ₂ CCHCH); 132.7, 132.3 (-NCH ₂ CCHC, -NCH ₂ CCHCC); 128.0, 127.6, 127.5, 126.3, 126.0, 125.9, 125.4 (8 x -CH _{Ar}); 117.5 (-C _{Ar} CN); 115.4 (-CN); 79.3 (-C(CH ₃) ₃); 66.2, 53.1, 48.6-45.5, 37.2 (C1, C2, C3, C4, C5, -CH ₂ C _{Ar}); 27.8 (-C(CH ₃) ₃); 25.5 (-SiC(CH ₃) ₃); 17.7 (-SiC(CH ₃) ₃); -5.1 (-Si(CH ₃) ₂).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 636.41$ ([M+H] ⁺); 653.32 ([M+NH ₄] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₃₄ H ₄₅ N ₃ O ₅ SSiNa): $m/z = 658.274692$
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 658.278201
EA	berechnet: C: 64.20 % H: 7.11 % N: 6.63 % gefunden: C: 64.35 % H: 7.30 % N: 6.41 %
Smp.	85 °C

Tert-butyl (3*R*,5*S*)-3-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxy-5-[(4-cyanophenyl)sulfonyl]-[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino]piperidin-1-carboxylat (120)

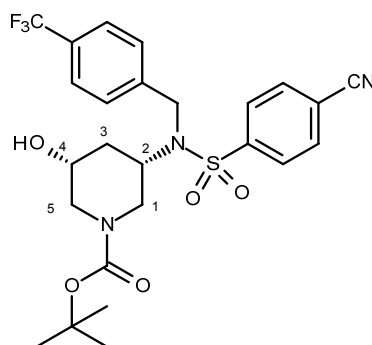


Mittels **AAV4** wurden 1.5 g der Verbindung **117** (3.03 mmol) mit 1.48 g (4.54 mmol) Cs₂CO₃ und 0.869 g (2.63 mmol) 4-(Trifluormethyl)benzylbromid umgesetzt. Die

Aufreinigung des Produktes erfolgte mittels MPLC (*iso*-Hexan:MTBE 4.5:1). Verbindung **120** wurde als farbloser Feststoff (1.6 g, 2.45 mmol, 81%) erhalten.

Ausbeute	1.6 g (2.45 mmol, 81 %)
	farblose Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.92 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.81 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.59 (d, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, -NCH ₂ CCHCH); 7.46 (d, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, -NCH ₂ CCH); 4.56 (sbr, 1H, -CH ₂ C _{Ar}); 4.38 (d, 1H, $^2J = 16.5$ Hz, -CH ₂ C _{Ar}); 4.10-3.70 (m, 3H, H2, H4, H1 _{a/b})*; 3.49 (ms, 1H, H1 _{a/b})*; 2.33 (t, 2H, H5)*; 1.81-1.49 (m, 2H, H3)*; 1.42 (s, 9H, -COOC(CH ₃) ₃); 0.82 (s, 9H, -SiC(CH ₃) ₃); 0.02 (s, 3H, -Si(CH ₃) ₂); -0.01 (s, 3H, -Si(CH ₃) ₂).
¹³C-NMR (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 154.1 (-CO ₂ C(CH ₃) ₃); 144.8 (-SO ₂ C _{Ar}); 141.2 (-NCH ₂ C _{Ar}); 133.1 (-SO ₂ CCHCH); 130.3 (q, $^2J = 32.8$ Hz, -C _{Ar} CF ₃); 127.9 (-SO ₂ CCH); 127.5 (-CHCHCCF ₃); 125.7 (q, $^3J = 2.9$ Hz, -CHCCF ₃); 123.8 (q, $^1J = 272.6$ Hz, -CF ₃); 117.1 (-C _{Ar} CN); 116.6 (-CN); 80.5 (-C(CH ₃) ₃); 66.7 (-NCH ₂ C _{Ar}); 53.7, 50.8, 47.9, 46.1, 39.7 (C1, C2, C3, C4, C5); 28.2 -(C(CH ₃) ₃); 25.6 (-SiC(CH ₃) ₃); 18.0 -SiC(CH ₃) ₃ ; -4.9 (s, -Si(CH ₃) ₂).
MS (ES+, RT)	m/z = 654.4 ([M+H] ⁺); 671.5 ([M+NH ₄] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₃₁ H ₄₂ F ₃ N ₃ O ₅ SSiNa): m/z = 676.246427
(ES+, RT)	gefunden: 676.245648
EA	berechnet: C: 56.95 % H: 6.47 % N: 6.43 % gefunden: C: 56.96 % H: 6.56 % N: 6.24 %
Smp.	72-73 °C

***Tert*-butyl (3*S*,5*R*)-3-[(4-cyanophenyl)sulfonyl]-[[4-(trifluormethyl) phenyl]methyl] amino]-5-hydroxy-piperidin-1-carboxylat (**123c**)**

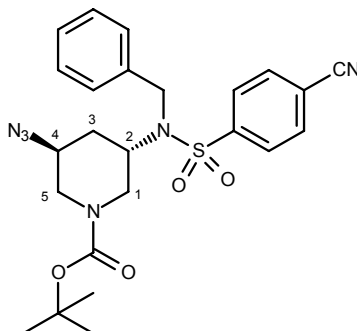


Die Abspaltung der TBDMS Schutzgruppe der Verbindung **120** erfolgte in Anlehnung an **AAV5**, wobei 1.5 g (2.29 mmol) der Verbindung **120** mit 2.7 ml 1M TBAF-Lösung zur Reaktion gebracht wurden. Das gewünschte Produkt wurde mittels MPLC (DCM:MeOH, 45:1) aufgereinigt und in Form farbloser Kristalle (950 mg, 1.76 mmol, 77 %) erhalten.

Ausbeute	950 mg (1.76 mmol, 77 %) farblose Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.91 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.2$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.82 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.60 (d, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, -NCH ₂ CCHCH); 7.47 (d, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, -NCH ₂ CCH); 4.61-4.36 (sbr, 2H, -CH ₂ C _{Ar}); 4.13 (ms, 1H, H ₄)*; 3.98-3.68 (m, 2H, H ₂ , H _{1a/b})*; 3.61 (ms, 1H, H _{1a/b})*; 2.38-1.90 (sbr, 4H, H ₅ , H ₃)*; 1.42 (s, 9H, -COOC(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 154.1 (-CO ₂ C(CH ₃) ₃); 144.8 (-SO ₂ C _{Ar}); 141.1 (-NCH ₂ C _{Ar}); 133.3 (-SO ₂ CCHCH); 130.3 (q, $^2J = 33.7$ Hz, -C _{Ar} CF ₃); 128.1 (-SO ₂ CCH); 127.6 (CF ₃ CCHCH); 125.9 (q, $^3J = 2.9$ Hz, CF ₃ CCH); 124.0 (q, $^1J = 272.1$ Hz, CF ₃); 117.2 (-C _{Ar} CN); 116.6 (-CN); 80.9 (-C(CH ₃) ₃); 66.8 (-NCH ₂ C _{Ar}); 54.0, 49.8, 48.1, 37.8, 34.6 (C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅); 28.4 (-C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 540.2 ([M+H] ⁺); 557.2 ([M+NH ₄] ⁺); 562.2 ([M+Na] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₂₅ H ₂₈ F ₃ N ₃ O ₅ SNa): m/z = 562.159948

(ES ⁺ , RT)	gefunden:	562.162569
EA	berechnet für:	C: 55.65 % H: 5.23 % N: 7.79 %
	gefunden:	C: 55.23 % H: 5.44 % N: 7.71 %
Smp.	103-105 °C	

***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-azido-5-[benzyl-(4-cyanophenyl)sulfonyl-amino]piperidin-1-carboxylat (**124a**)**



Nach **AAV5** wurde 1.1 g der Verbindung **118** (1.88 mmol) entschützt und mittels MPLC aufgereinigt (DCM:MeOH 45:1). Der entstandene Alkohol **123a** wurde in der nächsten Reaktion zum Azid umgewandelt. Dazu wurde 490 mg Triphenylphosphin (1.87 mmol, 1.2 eq) in 24 ml trockenem THF unter Argonfluss gelöst und im Eis-Salzbad auf -15°C gekühlt. Anschließend wurde 350 µl Diethylazodicarboxylat (DEAD, 2.18 mmol, 1.4 eq) langsam zugetropft, so dass die Temperatur nicht über -10°C stieg. Nach 30 min Rühren wurden 735 mg Alkohol (1.56 mmol, 1 eq) in 4 ml THF (trocken) gelöst, zugesetzt und anschließend für weitere 30 min bei -10°C gerührt. 506 µl DPPA (2.34 mmol, 1.5 eq) wurden zugetropft und das Reaktionsgemisch langsam auf RT aufgewärmt. Der Ansatz wurde zur Vervollständigung der Reaktion über Nacht gerührt und das gewünschte Produkt **124a** mittels MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 4:1) aufgereinigt und 655 mg farblosen Öls (1.32 mmol, 70 % über 2 Stufen) erhalten.

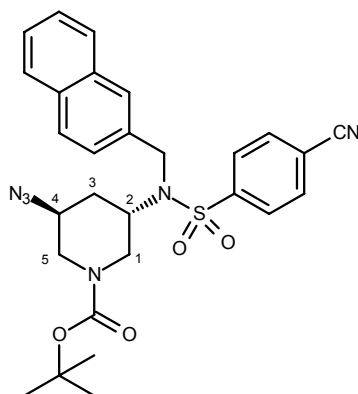
Ausbeute	655 mg (1.32 mmol, 70 % über 2 Stufen)
	farbloses Öl
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 519.4$ ($[M+Na]^+$); 1015.8 ($[2M+Na]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₂₄ H ₂₈ N ₆ O ₄ SNa): $m/z = 519.179045$

(ES⁺, RT)

gefunden:

519.178394

***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-azido-5-[(4-cyanophenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]piperidin-1-carboxylat (**124b**)**



Nach **AAV5** wurden 4.68 g der Verbindung **119** (7.36 mmol) entschützt und mittels MPLC aufgereinigt (DCM:MeOH 45:1). Der entstandene Alkohol **123b** wurde in der nächsten Reaktion zum Azid umgewandelt. Dazu wurden 1.93 g Triphenylphosphin (7.36 mmol, 1.2 eq) in 94 ml trockenem THF unter Argonfluss gelöst und im Eis-Salzbad auf -15°C gekühlt. Anschließend wurde 1.35 ml Diethylazodicarboxylat (DEAD, 8.59 mmol, 1.4 eq) langsam zugetropft, so dass die Temperatur nicht über -10°C stieg. Nach 30 min Rühren wurden 3.2 g Alkohol (6.14 mmol, 1 eq) in 15 ml THF (trocken) gelöst, zugesetzt und anschließend für weitere 30 min bei -10°C gerührt. 1.99 ml DPPA (9.20 mmol, 1.5 eq) wurden zugetropft und das Reaktionsgemisch langsam auf RT aufgewärmt. Der Ansatz wurde zur Vervollständigung der Reaktion über Nacht gerührt und das gewünschte Produkt mittels MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 5:1) aufgereinigt und 3.1 g farbloser Feststoff (5.67 mmol, 77 % über 2 Stufen) erhalten.

Ausbeute

3.1 g (5.67 mmol, 77 % über 2 Stufen)

farbloser Feststoff

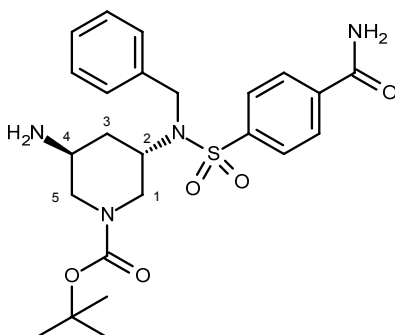
¹H-NMR

(400 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 8.12 (d, 2H, $^3J + ^5J = 7.8$ Hz, -SO₂CCH); 8.06 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO₂CCHCH); 7.95-7.83 (m, 4H, 4 x -CH_{Naphthyl}); 7.55-7.49 (m, 3H, 3 x -CH_{Naphthyl}); 4.83-4.53 (mbr, 2H, -CH₂C_{Ar}); 4.02-3.61 (mbr, 4H, H2, H4, H5)*; 2.82-2.61 (mbr, 2H, H1)*; 1.85 (mbr, 1H, H3)*; 1.31 (dbr, 9H,

	-COOC(CH ₃) ₃); 1.18 (m, 1H, H ₃ ,)*.
MS (ES+, RT)	$m/z = 569.2$ ($[M+Na]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₂₈ H ₃₀ N ₆ O ₄ SNa): $m/z =$ 569.194695
(ES+, RT)	gefunden: 569.191237

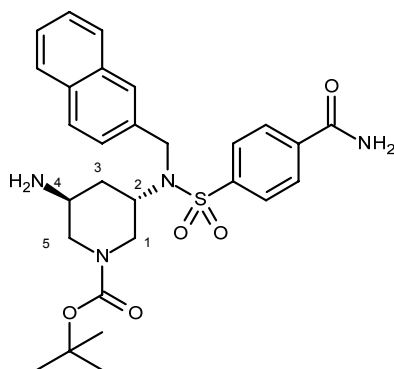
***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-amino-5-[benzyl-(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-amino]piperidin-1-carboxylat (**125a**)**



600 mg der Verbindung **124a** (1.21 mmol) wurde nach **AAV6** mit 6 ml 30%iger H₂O₂-Lösung und 83 mg K₂CO₃ (0.60 mmol) hydrolysiert und das entsprechende Carboxamid wurde als farbloser Feststoff (1.17 mmol, 96 %) erhalten. Dieser wurde in 16 ml trockenem DCM gelöst und vor der Zugabe von 370 mg TPP (1.40 mmol, 1.2 eq) im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach 1 h im Eisbad wurde für weitere 7 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 23 ml eines 1:1 Gemisches aus THF und NH₃/aq versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 9:1) und 526 mg des gewünschten Produkts **125a** (1.08 mmol, 89 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute	526 mg (1.08 mmol, 89 % über 2 Stufen)
	farbloser Feststoff
MS (ES+, RT)	$m/z = 489.5$ ($[M+H]^+$); 977.9 ($[2M+H]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₂₄ H ₃₃ N ₄ O ₅ S): $m/z =$ 489.217167
(ES+, RT)	gefunden: 489.214896

***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-amino-5-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]piperidin-1-carboxylat (**125b**)**

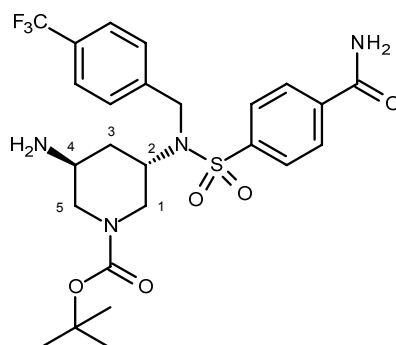


2.71 g der Verbindung **124b** (4.95 mmol) wurden nach **AAV6** mit 27 ml 30%iger H₂O₂-Lösung und 379 mg K₂CO₃ (2.74 mmol) hydrolysiert und das entsprechende Carboxamid wurde mittels MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc 1:1) aufgereinigt und 2.0 g des farblosen Feststoffs (3.54 mmol, 72 %) erhalten. Dieser wurde in 70 ml trockenem DCM gelöst und vor der Zugabe von 1.12 g TPP (4.25 mmol, 1.2 eq) im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach 1 h im Eisbad wurde für weitere 7 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit 70 ml eines 1:1 Gemisches aus THF und NH₃/aq versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 9:1) und 1.60 g des gewünschten Produkts (2.97 mmol, 60 %) wurden als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute	1.60 g (2.97 mmol, 60 % über 2 Stufen) farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.19 (sbr, 1H, -CONH ₂); 8.08 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -SO ₂ CCH); 7.99 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.94-7.84 (m, 4H, 4 x -CH _{Naphthyl}); 7.61 (sbr, 1H, -CO ₂ NH ₂); 7.57-7.48 (m, 3H, 3 x -CH _{Naphthyl}); 4.73-4.45 (m, 2H, -CH ₂ C _{Ar}); 4.31 (sbr, 1H, H ₂)*; 3.80-3.52 (sbr, 2H, H ₁)*; 3.03 (sbr, 1H, H ₄)*; 2.68-2.31 (sbr, 2H, H ₅)*; 1.67-1.40 (m, 3H, H ₃ , -NH ₂)*; 1.30 (sbr, 9H, -COOC(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 166.5 (-CONH ₂); 154.5 (-CO ₂ C(CH ₃) ₃); 142.8 (-SO ₂ C _{Ar}); 138.0 (-C _{Ar} CONH ₂); 136.5 (-NCH ₂ C _{Ar}); 132.7,

	132.2 (-NCH ₂ CCHC, -NCH ₂ CCHCC); 128.6, 127.9, 127.5, 126.7, 126.3, 125.9, 125.8, 125.5 (9 x -CH _{Ar}); 78.6 (-C(CH ₃) ₃); 50.1, 48.6, 47.6, 45.5, 35.0 (C1, C2, C3, C4, C5, -CH ₂ C _{Ar}); 27.9 (-C(CH ₃) ₃).
MS (ES+, RT)	m/z = 539.22 ($[M+H]^+$); 1077.21 ($[2M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₂₈ H ₃₅ N ₄ O ₅ S): m/z = 539.232817
(ES+, RT)	gefunden: 539.230955
EA	berechnet für * $\frac{1}{2}$ H ₂ O: C: 61.40 % H: 6.44 % N: 10.23 % gefunden: C: 61.06 % H: 6.60 % N: 10.19 %
Smp.	118-120 °C

***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-amino-5-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino] piperidin-1-carboxylat (**125c**)**



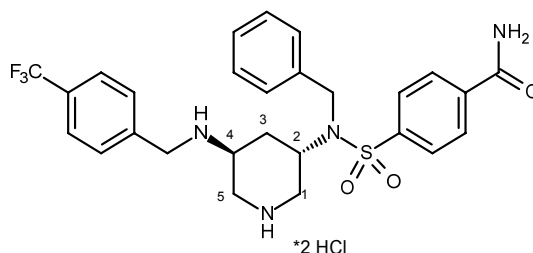
In einem Dreihalskolben unter Argon wurden 522 mg Triphenylphosphin (1.99 mmol, 1.2 eq) in 24 ml trockenem THF gelöst und im Eis-Salzbad auf -15 °C gekühlt. Diethylazodicarboxylat (365 µl, 2.32 mmol, 1.4 eq) wurde langsam zugetropft, sodass die Temperatur nicht über -10 °C anstieg. Nach 30 min wurden 895 mg des Alkohols **123c** (1.66 mmol, 1 eq) in wenig THF gelöst zugegeben und für weitere 30 min gerührt. Anschließend wurden 537 µl (2.49 mmol, 1.5 eq) DPPA ebenfalls langsam zugetropft und nach beendeter Zugabe durfte der Ansatz im Eis-Salzbad innerhalb von 10 h auf RT aufwärmen. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde noch für 5 h bei RT weiter gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc, 4:1) aufgereinigt. Das Azid wurde als farbloses Öl (637 mg, 1.13 mmol, 68 %) erhalten und im nächsten Schritt sofort weiter umgesetzt. Die Hydrolyse des Nitrils erfolgte unter Verwendung von **AAV6**.

Dabei wurden 500 mg des Azids **124c** mit 4.5 ml 30 %iger H₂O₂-Lösung und 61 mg K₂CO₃ umgesetzt. Das gewünschte Produkt wurde mittels MPLC (*iso*-Hexan:EtOAc, 1:1) aufgereinigt, als ein farbloses Öl (477 mg, 0.82 mmol, 92 %) isoliert und im nächsten Schritt zum entsprechenden Amin reduziert. Dazu wurden 400 mg (0.69 mmol, 1 eq) der Verbindung in 10 ml trockenem DCM gelöst. Vor der Zugabe von 217 mg (0.83 mmol, 1.2 eq) Triphenylphosphin wurde die Reaktion im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach 30 min im Eisbad wurde dieses entfernt und auf RT aufgewärmt. Nach 3 h bei RT wurde das DCM unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 ml NH₃/aq/THF (1:1) aufgenommen. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 9:1) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt wurde als farbloser Feststoff **125c** (173mg, 0.31 mmol, 54 %) erhalten.

Ausbeute	34 % über 3 Schritte farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 7.95 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO ₂ CCH); 7.91 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.59 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, -NCH ₂ CCHCH); 7.48 (d, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, -NCH ₂ CCH); 6.61-5.89 (sbr, 2H, -CONH ₂); 4.56-4.21 (sbr, 3H, -CH ₂ C _{Ar} , H ₂); 3.94 (d, 2H, $^2J = 10.8$ Hz, H ₁)*; 3.2 (sbr, 1H, -NH ₂); 2.71-2.40 (sbr, 3H, H ₅ , H ₄)*; 1.60-1.40 (sbr, 2H, H ₃)*; 1.41 (s, 9H, -COOC(CH ₃) ₃).
¹³C-NMR (100.53 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 167.9 (-CO ₂ NH ₂); 155.3 (-CO ₂ C(CH ₃) ₃); 143.4 (-SO ₂ C _{Ar}); 141.8 (-NCH ₂ C _{Ar}); 137.5 (-C _{Ar} CO ₂ NH ₂); 130.1 (q, $^2J = 31.8$ Hz, -C _{Ar} CF ₃); 128.5 (-SO ₂ CCHCH); 127.9 (-NCH ₂ CCH); 127.1 (-SO ₂ CCH); 125.6 (q, $^3J = 3.8$ Hz, CF ₃ CCH); 123.9 (q, $^1J = 271.7$ Hz, CF ₃); 80.4 (-C(CH ₃) ₃); 50.6, 49.2, 47.9, 46.1, 40.9 (C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅ , -CH ₂ C _{Ar}); 28.3 (-C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 557.21$ ([M+H] ⁺)
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₅ H ₃₂ F ₃ N ₄ O ₅ S): $m/z = 557.204552$ gefunden: 557.202066
EA	berechnet für *1½H ₂ O: C: 51.45 % H: 5.87 % N: 9.60 %

Smp.	gefunden:	C: 51.41 % H: 6.02 % N: 9.35 %
	132 °C	

4-[Benzyl-[(3*S*,5*S*)-5-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methylamino]-3-piperidyl]sulfamoyl]benzamid-Dihydrochlorid (127b)

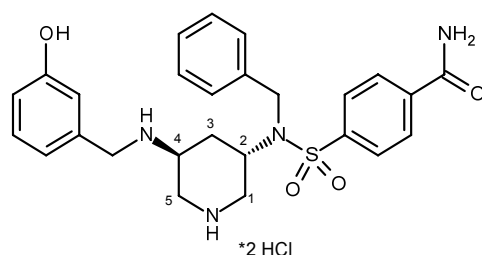


Unter der Verwendung der **AAV8** wurden 130 mg (0.27 mmol) des Amins **125a** mit 76 mg (0.32 mmol) 4-(Trifluoromethyl)benzylbromid und 44 mg (0.32 mmol) K_2CO_3 zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt **127a** wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) in Form eines farblosen Feststoffs isoliert. Dieser wurde im nächsten Schritt unter Verwendung von **AAV2** in 2 ml trockenem DCM gelöst und mit 2 ml 2M HCl in Et_2O versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % $NH_3/MeOH$). Das freie Amin wurde ins Dihydrochlorid überführt und 58 mg (0.094 mmol, 35 % über zwei Stufen) des gewünschten Produkts wurden als ein weißer Feststoff isoliert.

Ausbeute	58 mg (0.094 mmol, 35 % über zwei Stufen) weißer Feststoff
1H-NMR (400 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 10.10-9.45 (mbr, 4H, $-NH_2^+$); 8.19 (sbr, 1H, $-CONH_2$); 8.03 (ms, 4H, $-SO_2C\bar{C}H$, $-SO_2C\bar{C}H\bar{C}H$); 7.79 (sbr, 4H, $CF_3C\bar{C}H$, $CF_3C\bar{C}H\bar{C}H$); 7.61 (sbr, 1H, $-CONH_2$); 7.36-7.22 (m, 5H, 5 x $-C\bar{H}_{Benzyl}$); 4.81 (sbr, 1H, H2); 4.60 (d, $^2J = 16.7$ Hz, $-SO_2N\bar{C}H_2$); 4.44 (d, 2H, $^2J = 17.2$ Hz, $-SO_2N\bar{C}H_2$, H4); 4.11-3.94 (sbr, 1H, $-NH\bar{C}H_2C_{Ar}$)*; 3.79-3.61 (sbr, 2H, $-NH\bar{C}H_2C_{Ar}$, H1 _a)*; 3.13-2.92 (sbr, 2H, H1 _b , H5 _a)*; 2.75 (ms, 1H, H5 _b)*; 2.11-1.92 (sbr, 2H, H3).
^{13}C-NMR (100.53 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 166.3 ($-C\bar{O}NH_2$); 142.2 ($-SO_2C_{Ar}$); 138.2 ($-SO_2N\bar{C}H_2C_{Ar}$); 138.1 ($-NH\bar{C}H_2C_{Ar}$); 131.1; 128.6; 128.3;

	127.2; 127.0 (5 x $-\underline{\text{CH}}_{\text{Ar}}$); 126.9 (d, $^2J = 35.6$ Hz, $-\underline{\text{CCF}}_3$) 125.3 (d, $^3J = 3.9$ Hz, $\text{CF}_3\underline{\text{CCH}}$); 124.0 (d, $^1J = 267.8$ Hz, $-\underline{\text{CF}}_3$); 51.7; 48.2 ($-\text{SO}_2\underline{\text{NCH}}_2$, $-\text{NH}\underline{\text{CH}}_2$); 47.2; 47.0; 43.8; 40.1; 28.6 (3 x $-\text{CH}_2\text{Ring}$, 2 x $-\text{CH}_{\text{Ring}}$).
MS (ES+, RT)	$m/z = 547$ ($[M+H]^+$).
HR-MS	berechnet für ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$): $m/z = 547.199073$
(ES+, RT)	gefunden: 547.201765
Smp.	184 °C

4-[Benzyl-[(3*S*,5*S*)-5-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]-3-piperidyl]sulfamoyl]benzamid-Dihydrochlorid (128b**)**

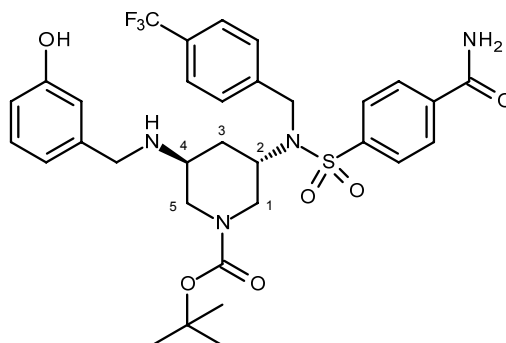


Unter der Verwendung der **AAV7** wurden 130 mg (0.27 mmol) des Amins **125a** mit 195 mg (1.60 mmol) 3-Hydroxybenzaldehyd und 81 mg (2.13 mmol) NaBH_4 zur Reaktion gebracht. Das Zwischenprodukt **128a** wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) in Form farbloser Kristalle (100 mg, 0.17 mmol) in einer Ausbeute von 63 % erhalten. Dieses wurde im nächsten Schritt unter Verwendung von **AAV2** in 2 ml trockenem DCM gelöst und mit 2 ml 2M HCl in Et_2O versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH_3/MeOH). Das freie Amin wurde ins Dihydrochlorid **128b** überführt und 80 mg (0.14 mmol, 52 % über zwei Stufen) des gewünschten Produkts wurden als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute	80 mg (0.14 mmol, 52 % über zwei Stufen) farbloser Feststoff
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_6 -DMSO)	δ [ppm] = 10.00-9.41 (sbr, 5H, $-\underline{\text{OH}}$, $-\underline{\text{NH}}_2^+$); 8.22 (sbr, 1H, $-\text{CONH}_2$); 8.07 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.9$ Hz, $-\text{SO}_2\underline{\text{CCH}}$); 8.04 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, $-\text{SO}_2\underline{\text{CCHCH}}$); 7.63 (sbr, 1H, $-\text{CONH}_2$), 7.39 (m, 5H, 5 x $-\underline{\text{CH}}_{\text{Benzyl}}$); 7.21 (t, 1H, $^3J = 7.8$ Hz,

	<p>HOCCHCH); 7.00 (d, 1H, $^3J = 7.3$ Hz, HOCCHCHCH); 6.96 (s, 1H, HOCCHC); 6.81 (dd, 1H, $^3J = 8.1$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, HOCCHCH); 4.82 (ms, 1H, H₂)*; 4.62 (d, 1H, $^2J = 16.9$ Hz, -SO₂NCH₂); 4.44 (d, 1H, $^2J = 17.2$ Hz, -SO₂NCH₂); 4.32-4.20 (m, 1H, H₄)*; 3.89 (d, 1H, $^2J = 14.4$ Hz, -NCH₂); 3.70 (m, 2H, H₁, -NCH₂)*; 3.16-2.98 (m, 2H, H₁, H₅)*; 2.79-2.72 (m, 1H, H₅)*; 2.13-1.97 (m, 2H, H₃)*.</p>
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	<p>δ [ppm] = 166.3 (-CONH₂); 157.5 (-C_{Ar}OH); 142.2 (-SO₂C_{Ar}); 138.2; 138.1; 129.6 (-NHCH₂C_{Ar}, -SO₂CCHCHC, -NCH₂C_{Ar}); 128.6, 128.3, 128.2, 127.23, 127.20, 126.9, 120.6 (7 x -CH_{Ar}); 117.1 (HOCCHCHCH); 116.0 (HOCCHCH); 51.4, 48.9 (-SO₂NCH₂, -NHCH₂); 47.2, 47.0, 43.7, 40.5, 28.5 (3 x -CH₂Ring, 2 x -CH_{Ring}).</p>
MS (ES+, RT)	$m/z = 495$ ($[M+H]^+$).
HR-MS	berechnet für (C ₂₆ H ₃₁ N ₄ O ₄ S): $m/z = 495.206603$
(ES+, RT)	gefunden: 495.206057
EA	<p>berechnet für *2H₂O: C: 51.74 % H: 6.01 % N: 9.28 %</p> <p>gefunden: C: 51.71 % H: 6.29 % N: 9.26 %</p>
Smp.	238-240 °C

***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl]-[4-(trifluormethyl)phenyl]methyl]amino]-5-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]piperidin-1-carboxylat (**129a**)**

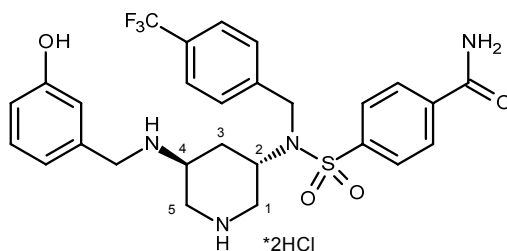


Unter der Verwendung der **AAV7** wurden 60 mg (0.11 mmol) des Amins **125c** mit 80 mg (0.65 mmol) 3-Hydroxybenzaldehyd und 33 mg (0.86 mmol) NaBH₄ zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt wurde nach Aufreinigung mittels MPLC

(DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) in Form eines farblosen Pulvers (50 mg, 0.08 mmol) und in einer Ausbeute von 70 % erhalten.

Ausbeute	50 mg (0.08 mmol, 70 %)
	farbloses Pulver
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 663.3$ ($[M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₃₂ H ₃₈ F ₃ N ₄ O ₆ S): $m/z =$ 663.246417
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 663.249937

4-[[[(3*S*,5*S*)-5-[(3-Hydroxyphenyl)methylamino]-3-piperidyl]-[[4-(trifluormethyl)phenyl] methyl]sulfamoyl]benzamid-Dihydrochlorid (129b**)**

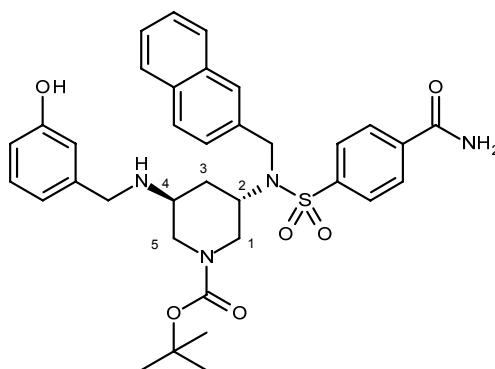


40 mg (0.06 mmol) der Verbindung **129a** wurden unter Verwendung der **AAV2** in 1 ml trockenem DCM gelöst und mit 1 ml 2M HCl in Et₂O versetzt. Das ausgefällte Dihydrochlorid **129b** wurde mit Et₂O gewaschen und 26 mg (0.05 mmol, 77 %) des gewünschten Produkts wurden als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute	26 mg (0.05 mmol, 77 %)
	farbloser Feststoff
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.99-9.40 (m, 4H, 2 x -NH ₂ ⁺); 8.22 (sbr, 1H, -CONH ₂); 8.09 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.2 Hz, -SO ₂ CCH); 8.06 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.69 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.0 Hz, -NCH ₂ CCHCH); 7.61 (sbr, 1H, -CONH ₂); 7.58 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.0 Hz, -NCH ₂ CCH); 7.20 (t, 1H, ³ <i>J</i> = 8.2 Hz, HOCCHCH); 7.02-6.77 (m, 3H, 3 x -CH _{Ar}); 4.88 (ms, 1H, -NH ₂ ⁺ CH ₂ C _{Ar}); 4.72 (d, 1H, ² <i>J</i> = 17.6 Hz, -SO ₂ NCH ₂ C _{Ar}); 4.54 (d, 1H, ² <i>J</i> = 17.6 Hz, -SO ₂ NCH ₂ C _{Ar}); 4.28 (sbr, 1H, -NH ₂ ⁺ CH ₂ C _{Ar}); 3.92-3.65 (m, 3H, H ₂ , H ₄ , H _{5a});

	3.11 (ms, 2H, H ₁); 2.73 (ms, 1H, H _{5b}); 2.13-1.92 (m, 2H, H ₃); 1.22 (sbr, 1H, -OH).
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 166.3 (-C(=O)NH ₂); 157.5 (-C(=O)ArOH); 143.4 (-SO ₂ C(=O)Ar); 141.9 (-C(=O)ArCONH ₂); 138.3 (-NCH ₂ C(=O)Ar); 129.6 (-NHCH ₂ C(=O)Ar); 128.7, 127.8 (2 x -CH(=O)Ar); 127.7 (q, ² J = 31.8 Hz, -C(=O)ArCF ₃); 127.1 (1 x -CH(=O)Ar); 125.2 (q, ³ J = 2.9 Hz, CF ₃ C(=O)CH); 124.2 (q, ¹ J = 272.6 Hz, C(=O)F ₃); 120.6, 117.1, 115.9 (3 x -CH(=O)Ar); 51.4, 49.0 (2 x -NCH ₂ C(=O)Ar); 47.2, 46.4, 43.4, 40.4, 28.5 (3 x CH ₂ Ring, 2 x CHRing).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 563 ([M+H] ⁺)
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₇ H ₃₀ F ₃ N ₄ O ₄ S): m/z = 563.193987 gefunden: 563.194180
EA	berechnet für *2¼H ₂ O: C: 47.97 % H: 5.29 % N: 8.28 % gefunden: C: 48.05 % H: 5.10 % N: 7.82 %
Smp.	128.5 °C

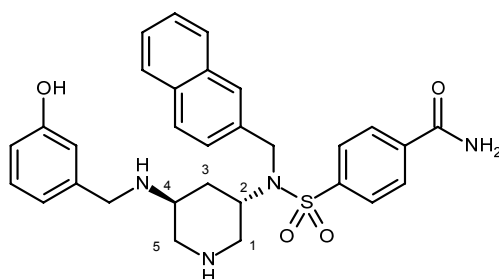
***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]-5-[(3-hydroxyphenyl)methylamino]piperidin-1-carboxylat (**130a**)**



Unter der Verwendung der **AAV7** wurden 170 mg (0.32 mmol) des Amins **125b** mit 231 mg (1.89 mmol) 3-Hydroxybenzaldehyd und 96 mg (2.53 mmol) NaBH₄ zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) in Form farbloser Kristalle (179 mg, 0.28 mmol) in einer Ausbeute von 88 % erhalten.

Ausbeute	179 mg (0.28 mmol, 88 %)
	farblose Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 9.27 (sbr, 1H, -OH); 8.21 (sbr, 1H, -CO ₂ NH ₂); 8.07 (d, 2H, ³ J + ⁵ J = 8.5 Hz, -SO ₂ CCH); 8.00 (d, 2H, ³ J + ⁵ J = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.94-7.83 (m, 4H, -CH _{Naphthyl}); 7.65 (sbr, 1H, -CONH ₂); 7.57-7.48 (m, 3H, -CH _{Naphthyl}); 7.10-7.00 (m, 1H, HOCCHCH); 6.69-6.59 (m, 3H, HOCCHCCH, HOCCHC, HOCCHCH); 4.80-4.50 (sbr, 2H, -NCH ₂ C _{Naphthyl}); 4.32-4.18 (sbr, 1H, H ₂) [*] ; 3.81-3.62 (sbr, 2H, -NHCH ₂ C _{Ar}); 3.50-3.35 (m, 2H, H ₁) [*] ; 2.71-2.51 (sbr, 2H, H ₅) [*] ; 1.81-1.40 (sbr, 3H, H ₄ , H ₃); 1.31 (dbr, 9H, -C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 645.29 ([M+H] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₃₅ H ₄₁ N ₄ O ₆ S): m/z = 645.274682
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 645.273904

4-[[[(3*S*,5*S*)-5-[(3-Hydroxyphenyl)methylamino]-3-piperidyl]-(2-naphthylmethyl)sulfamoyl]benzamid (130b)



150 mg (0.23 mmol) des Boc-geschützten Piperidins **130a** wurden unter Verwendung von **AAV2** in 2 ml trockenem DCM gelöst und mit 2 ml 2M HCl in Et₂O versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) und 80 mg (0.15 mmol, 64 %) des gewünschten Produkts wurden als ein leicht gelbes Pulver isoliert.

Ausbeute	80 mg (0.15 mmol, 64 %)
	leicht gelbes Pulver

¹H-NMR(400 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 9.21 (sbr, 1H, -OH); 8.19 (sbr, 1H, -CONH₂); 8.09 (d, 2H, ³*J* + ⁵*J* = 8.7 Hz, -SO₂CCH); 8.01 (d, 2H, ³*J* + ⁵*J* = 8.5 Hz, -SO₂CCHCH); 7.93-7.84 (m, 4H, -CH_{Naphthyl}); 7.62 (sbr, 1H, -CONH₂); 7.58-7.48 (m, 3H, -CH_{Naphthyl}); 7.05 (t, 1H, ³*J* = 7.8 Hz, HOCCHCH); 6.70 (m, 1H, HOCCHCCH); 6.62-6.56 (m, 2H, HOCCHC, HOCCHCH); 4.75 (d, 1H, ²*J* = 16.7 Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.54 (d, 1H, ²*J* = 16.7 Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.10 (m, 1H, H₂); 3.45 (d, 1H, ²*J* = 13.7 Hz, -NCH₂); 3.34 (d, 1H, ²*J* = 13.7 Hz, -NCH₂); 2.63-2.51 (m, 4H, H₄, H₁, -NH)*; 2.21 (m, 2H, H₅)*; 1.62-1.49 (m, 2H, H₃)*.

¹³C-NMR(100.53 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 166.5 (-CONH₂); 157.2 (-C_{Ar}OH); 143.1 (-SO₂C_{Ar}); 142.3 (-C_{Ar}CONH₂); 137.9 (-CH₂C_{Naphthyl}); 136.8 (-NHCH₂C_{Ar}); 132.7 (-NCH₂CCHC); 132.2 (-NCH₂CCHCHC); 128.9, 128.5, 127.8, 127.6, 127.5, 126.7, 126.2, 125.8, 125.6 (10 x -CH_{Ar}); 118.4 (HOCCHCHCH); 114.6 (HOCCHC); 113.4 (HOCCHCH); 52.1, 51.7 (2 x -CH₂C_{Ar}); 50.1, 49.8, 48.4, 47.3, 32.1 (3 x -CH₂/Ring, 2 x -CH_{Ring}).

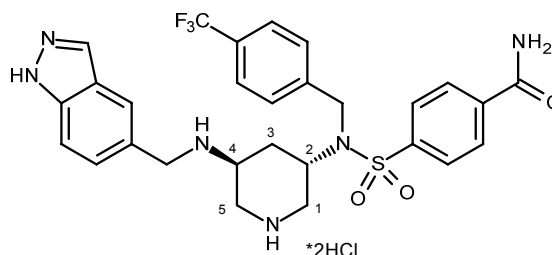
MS (ES⁺, RT)*m/z* = 545 ([*M*+H]⁺)**HR-MS**berechnet für (C₃₀H₃₃N₄O₄S): *m/z* = 545.222253(ES⁺, RT)

gefunden: 545.224561

Smp.

170-175 °C

4-[[[(3*S*,5*S*)-5-(1*H*-indazol-5-ylmethylamino)-3-piperidyl]-[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]sulfamoyl]benzamid-Dihydrochlorid (131b)



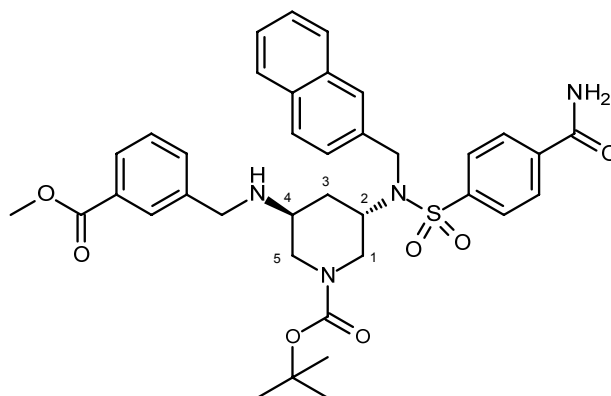
Unter Verwendung der **AAV7** wurden 120 mg (0.22 mmol) des Amins **125c** mit 198 mg (1.32 mmol) Indazol-5-carboxaldehyd und 69 mg (1.8 mmol) NaBH₄ zur Reaktion

gebracht. Das gewünschte Produkt **131a** wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) als farbloser Feststoff erhalten, der unter Verwendung der **AAV2** in 1 ml trockenem DCM gelöst und mit 1 ml 2M HCl in Et₂O versetzt wurde. Das ausgefällte Dihydrochlorid wurde mit Et₂O gewaschen und **131b** als farbloses Pulver (77 mg, 0.12 mmol, 53% über 2 Stufen) erhalten.

Ausbeute	77 mg (0.12 mmol, 53% über 2 Stufen) farbloses Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 10.31, 10.01, 9.65 (sbr, 4H, 2 x -NH ₂ ⁺); 8.26 (sb, 1H, -CONH ₂); 8.14 (s, 1H, -N=CH); 8.09 (sbr, 4H, -SO ₂ CCH, -SO ₂ CCHCH); 7.97 (s, 1H, -CH _{Indazol}); 7.73 (d, 2H, ³ J + ⁵ J = 8.2 Hz, -NCH ₂ CCHCH); 7.66 (sbr, 1H, -CONH ₂); 7.60 (sbr, 2H, 2 x -CH _{Indazol}); 7.59 (d, 2H, ³ J + ⁵ J = 8.0 Hz, -NCH ₂ CCH); 4.88 (ms, 1H, -NH ₂ ⁺ CH ₂ C _{Ar}); 4.75 (d, 1H, ² J = 17.6 Hz, -SO ₂ NCH ₂ C _{Ar}); 4.57 (d, 1H, ² J = 17.6 Hz, -SO ₂ NCH ₂ C _{Ar}); 4.48 (ms, 1H, -NH ₂ ⁺ CH ₂ C _{Ar}); 4.17 (m, 1H, H ₂) [*] ; 3.82-3.71 (m, 2H, H ₄ , H _{5a}) [*] ; 3.21-3.04 (m, 2H, H ₁) [*] ; 2.74-2.66 (m, 1H, H _{5b}) [*] ; 2.19-2.11 (m, 1H, H _{3a}); 2.00 (ms, 1H, H _{3b}).
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 166.3 (C _q , -CONH ₂); 143.4 (C _q , -SO ₂ C _{Ar}); 141.9 (C _q , -NHCH ₂ C _{Ar}); 139.9 (C _q , -C _{Ar} CONH ₂); 138.4 (C _q , -NCH ₂ C _{Ar}); 133.6, 128.7, 128.2 (3 x -CH _{Ar}); 127.82 (q, ² J = 31.8 Hz, -C _{Ar} CF ₃); 127.81, 127.1 (2 x -CH _{Ar}); 125.2 (q, ³ J = 2.9 Hz, CF ₃ CCH); 124.2 (q, ¹ J = 271.7 Hz, -CF ₃); 123.2, 123.0 (2 x -CH _{Ar}); 122.9 (C _q , -NHCCHC _{Ar}); 122.7 (C _q , -NHCCHCHC _{Ar}); 110.3 (-N=CH); 51.2 (CH, C ₂); 49.2 (CH ₂ , -CH ₂ C _{Ar}); 47.3 (CH, C ₄); 46.5 (CH ₂ , -CH ₂ C _{Ar}); 43.3, 40.4, 28.3 (3 x CH, C ₁ , C ₃ , C ₅).
MS (ES⁺, RT)	m/z = 587.2 ([M+H] ⁺).
HR-MS (ES ⁺ , RT)	berechnet für (C ₂₈ H ₃₀ F ₃ N ₆ O ₃ S): m/z = 587.205221 gefunden: 587.204325
EA	berechnet für *4H ₂ O: C: 45.97 % H: 5.37 % N: 11.49 % gefunden: C: 46.19 % H: 4.97 % N: 11.41 %

Smp.	142 °C
-------------	--------

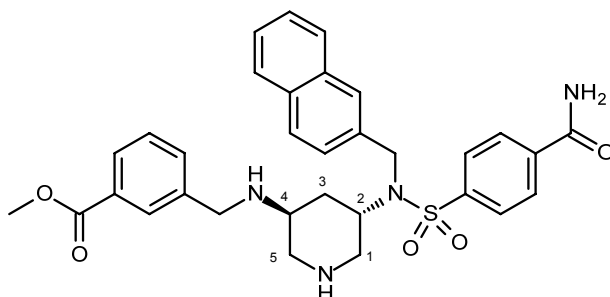
***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]-5-[(3-methoxycarbonylphenyl)methylamino]piperidin-1-carboxylat (**132a**)**



Unter der Verwendung der **AAV8** wurden 170 mg (0.32 mmol) des Amins **125b** mit 80 mg (0.35 mmol) 3-(Brommethyl)benzoesäuremethylester und 48 mg (0.35 mmol) K_2CO_3 zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt **132a** wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) in Form farbloser Kristalle (213 mg, 0.31 mmol) und in einer Ausbeute von 98 % erhalten.

Ausbeute	213 mg (0.31 mmol, 98 %)
	farblose Kristalle
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 687.2$ ($[M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₃₇ H ₄₃ N ₄ O ₇ S): $m/z =$ 687.284321
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 687.285247
Smp.	190 °C

Methyl 3-[[[(3*S*,5*S*)-5-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]-3-piperidyl]amino]methyl]benzoat (132b**)**



186 mg (0.27 mmol) der Verbindung **132a** wurden unter Verwendung von **AAV2** in 2 ml trockenem DCM gelöst und mit 1 ml 2M HCl in Et₂O versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) und 95 mg (0.16 mmol, 60 %) des gewünschten Produkts wurden in Form eines farblosen Pulvers isoliert.

Ausbeute

95 mg (0.16 mmol, 60%)

farbloses Pulver

¹H-NMR

(400 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 8.21 (sbr, 1H, -CONH₂); 8.08 (d, 2H, ³*J* + ⁵*J* = 8.7 Hz, -SO₂CCH); 8.00 (d, 2H, ³*J* + ⁵*J* = 8.7 Hz, -SO₂CCHCH); 7.93-7.85 (m, 6H, 4 x -CH_{Naphthyl}, MeOOCCHC, MeOOCCHCH); 7.64 (sbr, 1H, -CONH₂); 7.58-7.48 (m, 3H, 3 x -CH_{Naphthyl}); 7.36 (sps, 1H, MeOOCCHCH); 7.34 (sps, 1H, MeOOCCHCH); 4.79 (d, 1H, ²*J* = 16.7 Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.53 (d, 1H, ²*J* = 16.5 Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.06 (ms, 1H, H₂); 3.85 (s, 3H, -COOCH₃); 3.54 (d, 1H, ²*J* = 14.6 Hz, -NCH₂); 3.49 (d, 1H, ²*J* = 14.4 Hz, -NCH₂); 2.67-2.51 (m, 3H, H₄, H₁)*; 2.43 (sbr, 1H, -NH); 2.27-2.15 (m, 2H, H₅)*; 1.59 (ms, 1H, H₃)*; 1.52-1.43 (m, 1H, H₃)*.

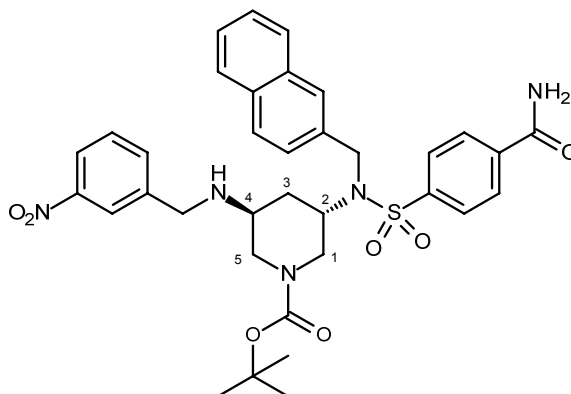
¹³C-NMR

(100.53 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 166.5 (-COOCH₃); 166.2 (-CONH₂); 146.8 (-SO₂C_{Ar}); 143.1 (-NHCH₂C_{Ar}); 137.9 (-SO₂CCHCHC); 136.8 (-NCH₂C_{Ar}); 132.7 (-NCH₂CCHCHC); 132.73 (MeOOC_{Ar}); 132.2 (-NCH₂CCHCHC); 129.0, 128.5, 127.84, 127.81, 127.57, 127.54, 126.8, 126.2, 125.84, 125.80, 125.6 (13 x -CH_{Ar}); 52.0, 51.97, 51.93 (-SO₂NCH₂, -NHCH₂, -COOCH₃);

	50.1, 49.5, 48.4, 47.4, 32.1 (3 x -CH ₂ /Ring, 2 x -CH _{Ring}).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 587.1$ ($[M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₃₂ H ₃₅ N ₄ O ₅ S): $m/z =$ 587.232817
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 587.234309
EA	berechnet für * $\frac{1}{2}$ H ₂ O: C: 64.52 % H: 5.92 % N: 9.41 %
	gefunden: C: 64.53 % H: 6.01 % N: 9.18 %
Smp.	128 °C

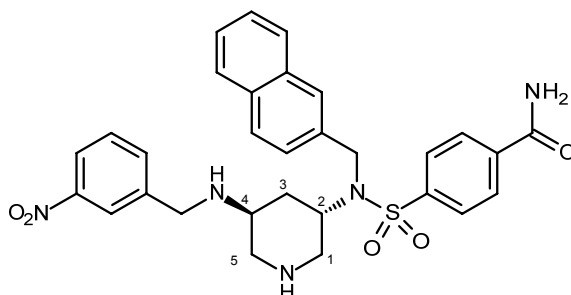
***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]-5-[(3-nitrophenyl)methylamino]piperidin-1-carboxylat (133a)**



Unter der Verwendung der **AAV8** wurden 340 mg (0.63 mmol) des Amins **125b** mit 150 mg (0.69 mmol) 3-Nitrobenzylbromid und 96 mg (0.69 mmol) K₂CO₃ zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) in Form eines leicht gelben Öls (400 mg, 0.59 mmol) und in einer Ausbeute von 90 % erhalten.

Ausbeute	400 mg (0.59 mmol, 90 %)
	leicht gelbes Öl
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 674.20$ ($[M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₃₅ H ₄₀ N ₅ O ₄ S): $m/z =$ 674.264047
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 674.264846

4-[2-Naphthylmethyl-[(3*S*,5*S*)-5-[(3-nitrophenyl)methylamino]-3-piperidyl]sulfamoyl]benzamid (133b)

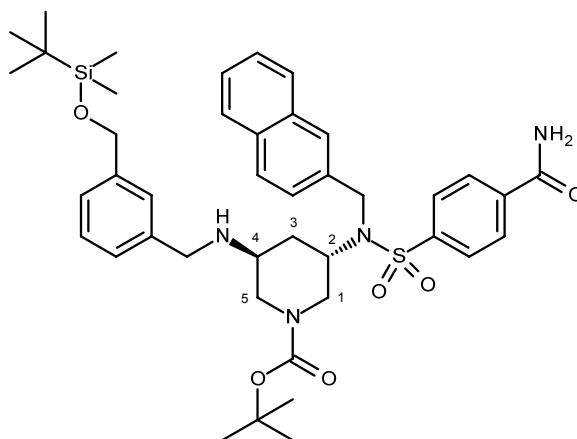


170 mg (0.25 mmol) der Verbindung **133a** wurden unter Verwendung von **AAV2** in 1 ml trockenem DCM gelöst und mit 1 ml 2M HCl in Et₂O versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) und 101 mg (0.18 mmol, 70 %) des gewünschten Produkts wurden als leicht gelbes Pulver isoliert.

Ausbeute	101 mg (0.18 mmol, 70 %)
	leicht gelbes Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 8.18 (sbr, 1H, -CONH ₂); 8.14 (ms, 1H, NO ₂ CCHC); 8.09-8.06 (m, 1H, NO ₂ CCHCH); 8.07 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.7 Hz, -SO ₂ CCH); 8.00 (d, 2H, ³ <i>J</i> + ⁵ <i>J</i> = 8.5 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.93-7.85 (m, 4H, 4 x -CH _{Naphthyl}); 7.65 (ms, 1H, NO ₂ CCHCHCH); 7.61 (sbr, 1H, -CONH ₂); 7.57 (m, 2H, 2 x -CH _{Naphthyl}); 7.52-7.48 (m, 2H, NO ₂ CCHCH, -CH _{Naphthyl}); 4.77 (d, 1H, ² <i>J</i> = 16.5 Hz, -NCH ₂ C _{Naphthyl}); 4.54 (d, 1H, ² <i>J</i> = 16.7 Hz, -SO ₂ NCH ₂ C _{Naphthyl}); 4.09 (ms, 1H, H ₂); 3.58 (s, 2H, -NHCH ₂); 2.67-2.51 (m, 3H, H ₄ , H ₁)*; 2.42 (sbr, 1H, -NH); 2.22 (ms, 2H, H ₅)*; 1.64-1.48 (m, 2H, H ₃)*.
¹³C-NMR (100.53 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 165.5 (-CONH ₂); 147.8 (-SO ₂ C _{Ar}); 143.6 (NO ₂ C _{Ar}); 143.1 (-NHCH ₂ C _{Ar}); 138.0 (-SO ₂ CCHCHC); 136.8 (-NCH ₂ C _{Ar}); 134.4 (NO ₂ CCHCHCH); 132.7 (-NCH ₂ CCHC); 132.2 (-NCH ₂ CCHCHC); 129.4, 128.5, 128.3, 127.9, 127.6, 127.5, 126.7, 126.4, 126.2, 125.8, 125.6 (10 x -CH _{Ar} , NO ₂ CCHCH); 122.1, 121.4 (2 x NO ₂ CCH); 52.15, 52.1 (2 x -CH ₂ C _{Ar}); 50.1, 49.0, 48.4, 47.4, 32.4 (3 x -CH ₂ Ring, 2 x -CH _{Ring}).

MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 574.0$ ($[M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₃₀ H ₃₂ N ₅ O ₅ S): $m/z =$ 547.211957
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 547.212416
EA	berechnet für *½H ₂ O: C: 61.84 % H: 5.54 % N: 12.01 %
	gefunden: C: 62.00 % H: 5.63 % N: 11.98 %
Smp.	125 °C

***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[[3-[(*tert*-butyl(dimethylsilyl)oxymethyl]phenyl]methylamino]-5-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]piperidin-1-carboxylat (134a)**



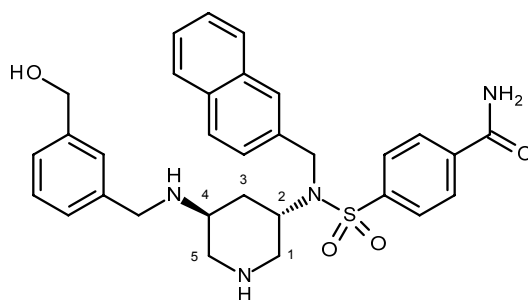
Der für diese Reaktion benötigte Aldehyd wurde wie folgt dargestellt: 1 g (7.45 mmol) Isophthalaldehyd wurden in 20 ml trockenem EtOH gelöst und nach Zugabe von 1.5 g gepulvertem Molekularsieb auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 71 mg (1.85 mmol, 0.25 eq) NaBH₄ zum Ansatz gegeben und für 2.5 h gerührt. Zur Vervollständigung der Reaktion wurden noch einmal 10 mg (0.26 mmol, 0.04 eq) NaBH₄ zugesetzt und bei 0°C weitere 2 h gerührt. Nach der Zugabe von 1 ml H₂O wurde mit EtOAc (3x10ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde zusammen mit 1.5 g (22.03 mmol, 3 eq) Imidazol und 1.3 g (8.63 mmol, 1.15 eq) TBDMSCl in 20 ml trockenem DCM über Nacht bei RT zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde der Ansatz mit 15 ml H₂O versetzt und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotavapor bis zur Trockne

eingeeengt, um den gewünschten Aldehyd als ein gelbes Öl mit einer Ausbeute von 47% (877 mg, 3.50 mmol) zu erhalten. Der so gewonnene Aldehyd wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

418 mg (1.67 mmol) des Aldehyds wurden unter Verwendung der **AAV7** mit 180 mg (0.33 mmol) des Amins **125b** und 88 mg (2.34 mmol) NaBH₄ zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 25:1) in Form eines farblosen Pulvers (160 mg, 0.21 mmol) in einer Ausbeute von 65 % erhalten.

Ausbeute	160 mg (0.21 mmol, 65 %)
	farbloses Pulver
MS (ES+, RT)	$m/z = 773.0$ ($[M+H]^+$); 795.4 ($[M+Na]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₄₂ H ₅₇ N ₄ O ₆ SSi): $m/z = 773.376811$
(ES+, RT)	gefunden: 773.380697
Smp.	83 °C

4-[[[(3*S*,5*S*)-5-[[3-(hydroxymethyl)phenyl]methylamino]-3-piperidyl]-(2-naphthylmethyl)sulfamoyl]benzamid (**134b**)



140 mg (0.18 mmol) der Verbindung **134a** wurden unter Verwendung von **AAV2** in 1 ml trockenem DCM gelöst und mit 2 ml 2M HCl in Et₂O versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) und 75 mg (0.13 mmol, 75 %) eines leicht beigen Feststoffs **134b** konnten isoliert werden.

Ausbeute	75 mg (0.13 mmol, 75 %)
	leicht beiger Feststoff

¹H-NMR(400 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 8.19 (sbr, 1H, -CONH₂); 8.08 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.5$ Hz, -SO₂CCH); 8.00 (d, 2H, $^3J + ^5J = 8.7$ Hz, -SO₂CCHCH); 7.93-7.84 (m, 4H, 4 x -CH_{Naphthyl}); 7.62 (sbr, 1H, -CONH₂); 7.58-7.48 (m, 3H, 3 x -CH_{Naphthyl}); 7.22 (t, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, -NHCH₂CCHC)*; 7.19-7.13 (m, 2H, -NHCH₂CCHCH, -NHCH₂CCHCH)*; 7.06 (d, 1H, $^3J = 7.3$ Hz, -NHCH₂CCHCHCH)*; 5.13 (t, 1H, $^3J = 5.3$ Hz, -OH); 4.77 (d, 1H, $^2J = 16.5$ Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.54 (d, 1H, $^2J = 16.7$ Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.47 (d, 2H, $^3J = 4.1$ Hz, -C_{Ar}CH₂OH); 4.08 (ms, 1H, H₂); 3.49 (d, 1H, $^2J = 13.5$ Hz, -NHCH₂); 3.40 (d, 1H, $^2J = 13.7$ Hz, -NHCH₂); 2.63-2.51 (m, 3H, H₄, H₁)*; 2.23-2.17 (m, 2H, H₅)*; 1.61-1.50 (m, 2H, H₃)*.

¹³C-NMR(100.53 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 167.1 (-CONH₂); 143.7 (-SO₂C_{Ar}); 142.8 (-NHCH₂C_{Ar}); 141.1 (-C_{Ar}CH₂OH); 138.5 (-C_{Ar}CONH₂); 137.4 (-NCH₂C_{Ar}); 133.3 (-NCH₂CCHC); 132.8 (-NCH₂CCHCHC); 129.1, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.3, 126.8, 126.7, 126.5, 126.4, 126.2, 125.2 (13 x -CH_{Ar}); 63.5, 52.6, 52.4 (3 x -CH₂C_{Ar}); 50.7, 50.5, 49.1, 47.9, 32.7 (3 x -CH₂Ring, 2 x -CH_{Ring}).

MS (ES⁺, RT) $m/z = 559.1$ ($[M+H]^+$)**HR-MS**berechnet für (C₃₁H₃₅N₄O₄S): $m/z = 559.237903$ (ES⁺, RT)

gefunden: 559.238351

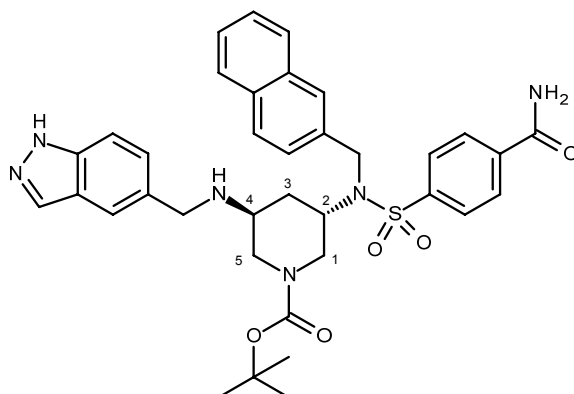
EAberechnet für * $\frac{1}{2}$ H₂O: C: 65.59 % H: 6.21 % N: 9.87 %

gefunden: C: 65.18 % H: 6.34 % N: 9.94 %

Smp.

115 °C

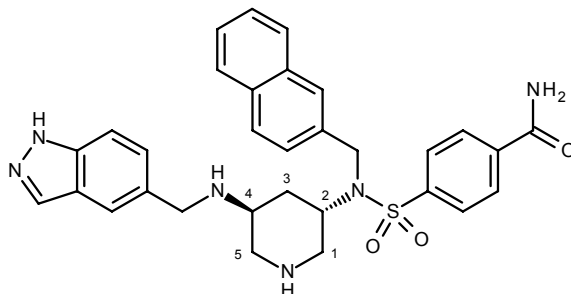
***Tert*-butyl (3*S*,5*S*)-3-[(4-carbamoylphenyl)sulfonyl-(2-naphthylmethyl)amino]-5-(1*H*-indazol-5-ylmethylamino)piperidin-1-carboxylat (135a)**



Unter Verwendung der **AAV7** wurden 170 mg (0.32 mmol) des Amins **125b** mit 277 mg (1.89 mmol) Indazol-5-carboxaldehyd und 96 mg (2.53 mmol) NaBH₄ zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (DCM:MeOH 45:1 bis 25:1) in Form farbloser Kristalle (150 mg, 0.22 mmol) in einer Ausbeute von 70 % erhalten.

Ausbeute	150 mg (0.22 mmol, 70 %)
	farblose Kristalle
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 12.97 (s, 1H, -NH-N=C); 8.23 (sbr, 1H, -CONH ₂); 8.09 (d, 2H, ³ J + ⁵ J = 8.5 Hz, -SO ₂ CCH); 8.02-7.98 (m, 3H, 3 x -CH _{Indazol}); 7.93 (d, 2H, ³ J + ⁵ J = 7.3 Hz, -SO ₂ CCHCH); 7.93-7.83 (m, 2H, 2 x -CH _{Naphthyl}); 7.67 (sbr, 1H, -CONH ₂); 7.56-7.39 (m, 5H, 5 x -CH _{Naphthyl}); 7.24 (d, 1H, ³ J = 8.5 Hz, -N=CH); 4.80-4.50 (m, 2H, -SO ₂ NCH ₂ C _{Naphthyl}); 4.25 (m, 1H, H ₂) [*] ; 3.90-3.51 (m, 4H, -NHCH ₂ , H ₁) [*] ; 2.71-2.52 (m, 3H, H ₄ , H ₅) [*] ; 1.91-1.42 (m, 3H, H ₃ , -NH) [*] ; 1.25 (d, 9H, ² J = 22.4 Hz, -C(CH ₃) ₃).
MS (ES ⁺ , RT)	m/z = 669.3 ([M+H] ⁺)
HR-MS	berechnet für (C ₃₆ H ₄₁ N ₆ O ₅ S): m/z = 669.285916
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 669.288061
Smp.	144 °C

4-[[[(3*S*,5*S*)-5-(1*H*-Indazol-5-ylmethylamino)-3-piperidyl]-(2-naphthylmethyl)sulfamoyl]benzamid (135b)



124 mg (0.19 mmol) der Verbindung **135a** wurden unter Verwendung der **AAV2** in 1 ml trockenem DCM gelöst und mit 2 ml 2M HCl in Et₂O versetzt. Die Aufreinigung erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH) und 71 mg (0.13 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffs **135b** konnten isoliert werden.

Ausbeute

71 mg (0.13 mmol, 68 %)

farbloser Feststoff

¹H-NMR

(400 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 13.06 (s, 1H, -NH-N=C); 8.25 (sbr, 1H, -CONH₂); 8.12 (d, 2H, ³*J* + ⁵*J* = 8.7 Hz, -SO₂CCH); 8.06 (d, 2H, ³*J* + ⁵*J* = 8.7 Hz, -SO₂CCHCH); 8.03 (m, 1H, -CH_{Indazol}); 7.93-7.84 (m, 4H, 2 x -CH_{Indazol}, 2 x -CH_{Naphthyl}); 7.65 (sbr, 1H, -CONH₂); 7.60 (sbr, 1H, -N=CH); 7.55-7.46 (m, 4H, 4 x -CH_{Naphthyl}); 7.33 (dd, 1H, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz, -CH_{Naphthyl}); 4.76 (d, 1H, ²*J* = 16.9 Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.66 (d, 1H, ²*J* = 16.7 Hz, -SO₂NCH₂C_{Naphthyl}); 4.48 (ms, 1H, H₂)*; 3.71 (ms, 2H, -NHCH₂); 3.10 (m, 2H, H_{1a/b})*; 3.00 (sbr, 1H, H_{1a/b})*; 2.84-2.77 (m, 1H, H₄)*; 2.69 (ms, 2H, H₅)*; 1.84-1.69 (m, 2H, H₃)*.

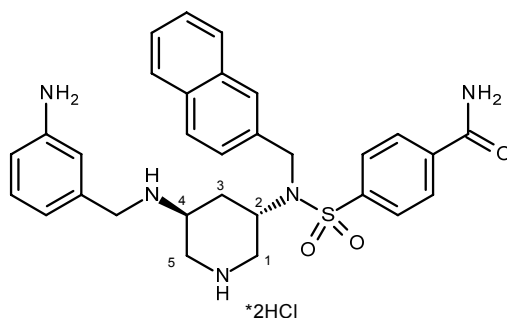
¹³C-NMR

(100.53 MHz, D₆-DMSO)

δ [ppm] = 166.4 (-CONH₂); 142.6 (-SO₂C_{Ar}); 139.4 (-NHCH₂C_{Ar}); 138.2 (-C_{Ar}CONH₂); 136.1 (-NCH₂C_{Ar}); 133.1 (-NCH₂CCHC); 132.7 (-NCH₂CCHCHC); 132.3 (-NHCH₂CCHCHC); 129.1, 128.7, 128.0, 127.6, 127.5, 127.1, 127.0, 126.3, 125.9, 125.8, 125.4 (10 x -CH_{Ar}, -NHCH₂CCHC); 122.7, 120.2 (2 x -CH_{Indazol}); 110.0 (-N=CH); 49.6, 49.2 (2 x -CH₂C_{Ar}); 48.8, 47.5, 46.2, 44.8, 29.9 (3 x

	-CH ₂ Ring, 2 x -CH _{Ring}).
MS (ES ⁺ , RT)	$m/z = 569.1$ ($[M+H]^+$)
HR-MS	berechnet für (C ₃₁ H ₃₃ N ₆ O ₃ S): $m/z = 569.233486$
(ES ⁺ , RT)	gefunden: 569.237267
EA	berechnet für *4H ₂ O: C: 58.11 % H: 6.29 % N: 13.12 %
	gefunden: C: 57.95 % H: 5.81 % N: 13.10 %
Smp.	211 °C

4-[[[(3*S*,5*S*)-5-[(3-Aminophenyl)methylamino]-3-piperidyl]-(2-naphthylmethyl)sulfamoyl]benzamid-Dihydrochlorid (136b**)**



Die Nitroverbindung **133a** (230 mg, 0.36 mmol) wurde in 15 ml EtOAc gelöst und mit 806 mg (3.57 mmol, 10 eq) Zinn-II-chlorid bei 80 °C für 6 h zur Reaktion gebracht. Nach vollständiger Umsetzung wurde der pH-Wert mit ges. NaHCO₃-Lösung auf 7-8 eingestellt und mit 3x15 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte über MPLC (10 % MeOH in DCM +0.1 % NH₃/MeOH). Das freie Amin wurde anschließend mittels HCl in Diethylether ins entsprechende Dihydrochlorid überführt und es wurden 80 mg (0.13 mmol, 36 %) eines beigen Pulvers **136b** erhalten.

Ausbeute	80 mg (0.13 mmol, 36 %)
	beiges Pulver
¹H-NMR (400 MHz, D ₆ -DMSO)	δ [ppm] = 10.20-9.55 (sbr, 4H, 2 x NH ₂ ⁺); 8.24 (sbr, 1H, -CONH ₂); 8.10 (ms, 4H, -SO ₂ CCH ₂ , -SO ₂ CCHCH ₂); 7.93-7.81 (m, 4H, 4 x -CH _{Naphthyl}); 7.63 (sbr, 1H, -CONH ₂); 7.54-7.48 (m,

^{13}C -NMR(100.53 MHz, D_6 -DMSO)

3H, 3 x $-\text{CH}_{\text{Naphthyl}}$); 7.43-7.00 (mbr, 4H, 4 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 4.92 (sbr, 2H, $-\text{C}_{\text{Ar}}\text{NH}_2$); 4.77 (d, 1H, $^2J = 16.5$ Hz, $-\text{SO}_2\text{NCH}_2\text{C}_{\text{Naphthyl}}$); 4.53 (d, 1H, $^2J = 16.5$ Hz, $-\text{SO}_2\text{NCH}_2\text{C}_{\text{Naphthyl}}$); 4.09 (m, 1H, H_2)^{*}; 3.51 (m, 1H, H_4)^{*}; 3.38 (d, 1H, $^2J = 13.5$ Hz, $-\text{NHCH}_2$); 3.26 (d, 1H, $^2J = 13.5$ Hz, $-\text{NHCH}_2$); 2.59 (m, 3H, H_1 , $-\text{NH}$)^{*}; 2.20 (m, 2H, H_5)^{*}; 1.60-1.48 (m, 2H, H_3)^{*}.

δ [ppm] = 166.3 ($-\text{CONH}_2$); 142.2 ($\text{NH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 138.2 ($-\text{SO}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 135.7 ($-\text{C}_{\text{Ar}}\text{CONH}_2$); 134.7 ($-\text{NCH}_2\text{C}_{\text{Naphthyl}}$); 132.9 ($-\text{NHCH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 132.7 ($-\text{NCH}_2\text{CCHC}$); 132.2 ($-\text{NCH}_2\text{CCHCC}$); 129.8 (NH_2CCHCH); 128.7, 128.0, 127.7, 127.5, 127.0, 126.3, 126.0, 125.9, 125.3 (9 x $-\text{CH}_{\text{Ar}}$); 123.4, 122.4, 122.3 (NH_2CCHC , NH_2CCHCH , NH_2CHCHCH); 51.7, 48.4 (2 x $-\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$); 47.34, 47.28, 43.8, 40.4, 28.5 (3 x $-\text{CH}_2/\text{Ring}$, 2 x $-\text{CH}_{\text{Ring}}$).

MS (ES⁺, RT) $m/z = 544.3$ ($[M+H]^+$)**HR-MS**berechnet für ($\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$): $m/z = 544.238237$ (ES⁺, RT)

gefunden: 544.241614

EAberechnet für $*4\text{H}_2\text{O}$: C: 52.32 % H: 6.29 % N: 10.17 %

gefunden: C: 52.55 % H: 6.08 % N: 10.03 %

Smp.

243 °C

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
BACE	β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CMC	critical micelle concentration
d. h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin oder Hünig-Base
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMPU	Dimethylpropylenharnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorazidat
EA	Elementaranalyse
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EI	electron impact
engl.	englisch
EP	Endothiapepsin
eq	Äquivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EWG	electron withdrawing group

FC	flash-column-chromatography
FDA	Food and Drug Administration
FQ	fit quality
g	Gramm
ges.	gesättigt
Gew.-%	Gewichtsprozent
gr.	griechisch
h	Stunde
HA	heavy atom
HAART	highly active antiretroviral therapy
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HR-MS	hochauflösende Massenspektrometrie
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
HTS	high-throughput-screening
Hz	Hertz
IN	HIV-Integrase
ITC	isothermal titration calorimetry
IUPAC	the international union of pure and applied chemistry
k.I.	keine Inhibition
kcal	Kilokalorie
K _M	Gleichgewichtskonstante
l	Liter
LE	Liganden Effizienz
m	Masse
M	Molar [mol/l]
m-	meta-
mM	Millimolar
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MPLC	medium pressure liquid chromatography

MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
n	Nano
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (von engl. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
o-	ortho-
p-	para-
Pa	Pascal
PG	protecting group
ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluenesulfonat
PR	HIV-Protease
r	Radius
R	Gaskonstante
RF	Rückfluss
rmsd	root-mean-square deviation
RNA	ribonucleic acid
Rochelle-Lösung	ges. Kalium-Natriumtartrat-Lösung
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase des HI-Virus
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung (von engl. <i>structure-activity relationship</i>)
sec	Sekunde
T	Temperatur
TBAF	<i>Tetra-n</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBME	siehe MTBE
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS	Trimethylsilyl-
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
TPP	Triphenylphosphin

TPPO	Triphenylphosphinoxid
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleich
WHO	World Health Organization
wt-%	Gewichtsprozent
z	Ladungszahl
z. B.	zum Beispiel
δ	Chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ν	Wellenzahl

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dash, C., A. Kulkarni, B. Dunn, and M. Rao, *Aspartic Peptidase Inhibitors: Implications in Drug Development*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2003. **38**(2): p. 89-119.
2. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *MEROPS: the peptidase database*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(1): p. 323-325.
3. *MEROPS the Peptidase database*.
4. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Evolutionary families of peptidases*. Biochem. J., 1993. **290**(1): p. 205-218.
5. Ghosh, A.K., *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*, ed. R. Mannhold, Kubinyi, H., Folkers, G. Vol. 45. 2010: WILEY-VCH. 23-25.
6. Cooper, J.B., *Aspartic Proteinases in Disease: A Structural Perspective*. Current Drug Targets, 2002. **3**(2): p. 155-173.
7. Coombs, G.H., D.E. Goldberg, M. Klemba, C. Berry, J. Kay, and J.C. Mottram, *Aspartic proteases of Plasmodium falciparum and other parasitic protozoa as drug targets*. Trends in Parasitology, 2001. **17**(11): p. 532-537.
8. Benes, P., V. Vetvicka, and M. Fusek, *Cathepsin D--Many functions of one aspartic protease*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2008. **68**(1): p. 12-28.
9. Dominguez, D.-I., Hartmann, D., De Strooper, B., *BACE1 and Presenilin: Two Unusual Aspartyl Proteases Involved in Alzheimer's Disease*. Neurodegenerative Diseases, 2004. **1**(4-5): p. 168-174.
10. Daenke, S., H.J. Schramm, and C.R.M. Bangham, *Analysis of substrate cleavage by recombinant protease of human T cell leukaemia virus type 1 reveals preferences and specificity of binding*. Journal of General Virology, 1994. **75**: p. 2233-2239.
11. Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, A.F. Gazdar, P.A. Bunn, J.D. Minna, and R.C. Gallo, *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1980. **77**(12): p. 7415-7419.
12. Schlaberg, R., D.J. Choe, K.R. Brown, H.M. Thaker, and I.R. Singh, *XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(38): p. 16351-16356.
13. Li, M., F. DiMaio, D. Zhou, A. Gustchina, J. Lubkowski, Z. Dauter, D. Baker, and A. Wlodawer, *Crystal structure of XMRV protease differs from the structures of other retropepsins*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(2): p. 227-229.
14. Lombardi, V.C., F.W. Ruscetti, J. Das Gupta, M.A. Pfof, K.S. Hagen, D.L. Peterson, S.K. Ruscetti, R.K. Bagni, C. Petrow-Sadowski, B. Gold, M. Dean, R.H. Silverman, and J.A. Mikovits, *Detection of an Infectious Retrovirus, XMRV, in Blood Cells of Patients with Chronic Fatigue Syndrome*. Science, 2009. **326**(5952): p. 585-589.
15. Tang, J., P. Sepulveda, J. Marciszyn, K.C.S. Chen, W.Y. Huang, N. Tao, D. Liu, and J.P. Lanier, *Amino-Acid Sequence of Porcine Pepsin*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973. **70**(12): p. 3437-3439.
16. Horimoto, Y., D.R. Dee, and R.Y. Yada, *Multifunctional aspartic peptidase prosegments*. New Biotechnology, 2009. **25**(5): p. 318-324.
 17. Ghosh, A.K., *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*, ed. R. Mannhold, Kubinyi, H., Folkers, G. Vol. 45. 2010: WILEY-VCH. 25-28.
 18. Dunn, B.M., *Structure and Mechanism of the Pepsin-Like Family of Aspartic Peptidases*. Chemical Reviews, 2002. **102**(12): p. 4431-4458.
 19. Tang, J., M.N.G. James, I.N. Hsu, J.A. Jenkins, and T.L. Blundell, *Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases*. Nature, 1978. **271**(5646): p. 618-621.
 20. Dunn, B., *Overview of Pepsin-like Aspartic Peptidases*. Current Protocols in Protein Science, 2001. **21.3**(25): p. 21.3.1-21.3.6.
 21. Wlodawer, A., M. Miller, M. Jaskolski, B.K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I.T. Weber, L.M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, and S.B. Kent, *Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease*. Science, 1989. **245**(4918): p. 616-621.
 22. Davies, D.R., *The Structure and Function of the Aspartic Proteinases*. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 1990. **19**(1): p. 189-215.
 23. Pearl, L.H. and W.R. Taylor, *A structural model for the retroviral proteases*. Nature, 1987. **329**(6137): p. 351-354.
 24. Ghosh, A.K., *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*, ed. R. Mannhold, Kubinyi, H., Folkers, G. Vol. 45. 2010: WILEY-VCH. 92-96.
 25. Pearl, L. and T. Blundell, *The active site of aspartic proteinases*. FEBS Letters, 1984. **174**(1): p. 96-101.
 26. Ingr, M., T.á. Uhlíková, K. Strišovský, E. Majerová, and J. Konvalinka, *Kinetics of the dimerization of retroviral proteases: The "fireman's grip" and dimerization*. Protein Science, 2003. **12**(10): p. 2173-2182.
 27. Ghosh, A.K., *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*, ed. R. Mannhold, Kubinyi, H., Folkers, G. Vol. 45. 2010: WILEY-VCH. 5-13.
 28. Veerapandian, B., J.B. Cooper, A. Šali, T.L. Blundell, R.L. Rosati, B.W. Dominy, D.B. Damon, and D.J. Hoover, *Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases*. Protein Science, 1992. **1**(3): p. 322-328.
 29. Ghosh, A.K., *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*, ed. R. Mannhold, Kubinyi, H., Folkers, G. Vol. 45. 2010: WILEY-VCH. 28-29.
 30. Klebe, G., *Wirkstoffdesign - Entwicklung und Wirkung von Arzneistoffen*. 2 ed. 2009: Spektrum. 381-402.
 31. Pauling, L., *Nature of forces between large molecules of biological interest*. Nature, 1948. **161**: p. 707-709.
 32. Nguyen, J.-T., Y. Hamada, T. Kimura, and Y. Kiso, *Design of Potent Aspartic Protease Inhibitors to Treat Various Diseases*. Archiv der Pharmazie, 2008. **341**(9): p. 523-535.
 33. Leung, D., G. Abbenante, and D.P. Fairlie, *Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. **43**(3): p. 305-341.
 34. Silbernagel, S., Despopoulos, A., *Taschenatlas der Physiologie*. 6.korrigierte Auflage ed. 2003: Thieme.

35. Hofbauer, K.G. and J.M. Wood, *Renin inhibitors as possible antihypertensive agents*. Journal of Molecular Medicine, 1988. **66**(18): p. 906-913.
36. Foundling, S.I., J. Cooper, F.E. Watson, A. Cleasby, L.H. Pearl, B.L. Sibanda, A. Hemmings, S.P. Wood, T.L. Blundell, M.J. Valler, C.G. Norey, J. Kay, J. Boger, B.M. Dunn, B.J. Leckie, D.M. Jone, B. Atrash, A. Hallett, and M. Szelke, *High resolution X-ray analyses of renin inhibitor-aspartic proteinase complexes*. Nature, 1987. **327**(6120): p. 349-352.
37. Blundell, T.L., J. Cooper, S.I. Foundling, D.M. Jones, B. Atrash, and M. Szelke, *On the rational design of renin inhibitors: x-ray studies of aspartic proteinases complexed with transition-state analogs*. Biochemistry, 1987. **26**(18): p. 5585-5590.
38. Bursavich, M.G. and D.H. Rich, *Designing Non-Peptide Peptidomimetics in the 21st Century: Inhibitors Targeting Conformational Ensembles*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **45**(3): p. 541-558.
39. Torrado, A., *Stereoselective synthesis of aminoethylamine aspartyl protease transition state isosteres*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(39): p. 7097-7100.
40. Yang, W., W. Lu, Y. Lu, M. Zhong, J. Sun, A.E. Thomas, J.M. Wilkinson, R.V. Fucini, M. Lam, M. Randal, X.-P. Shi, J.W. Jacobs, R.S. McDowell, E.M. Gordon, and M.D. Ballinger, *Aminoethylenes: A Tetrahedral Intermediate Isostere Yielding Potent Inhibitors of the Aspartyl Protease BACE-1*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. **49**(3): p. 839-842.
41. Marcinišzyn, J., J.A. Hartsuck, and J. Tang, *Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin*. Journal of Biological Chemistry, 1976. **251**(22): p. 7088-7094.
42. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, and M. Hamada, *Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes*. The Journal of Antibiotics, 1970. **23**(5): p. 259-262.
43. Charles, F., *Drug Therapy: HIV-Protease Inhibitors*. The New England Journal of Medicine, 1998. **338**(18): p. 1281-1292.
44. Noble, S. and D. Faulds, *Saquinavir: A Review of its Pharmacology and Clinical Potential in the Management of HIV Infection*. Drugs, 1996. **52**(1): p. 93-112.
45. Dann, J.G., D.K. Stammers, C.J. Harris, R.J. Arrowsmith, D.E. Davies, G.W. Hardy, and J.A. Morton, *Human renin: A new class of inhibitors*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1986. **134**(1): p. 71-77.
46. Bartlett, P.A. and W.B. Keizer, *Phosphinic acid dipeptide analogs: potent, slow-binding inhibitors of aspartic peptidases*. Journal of the American Chemical Society, 1984. **106**(15): p. 4282-4283.
47. Greenlee, W.J., *Renin Inhibitors*. Pharmaceutical Research, 1987. **4**(5): p. 364-374.
48. Lipinski, C.A., F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **23**(1-3): p. 3-25.
49. Veber, D.F., S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, and K.D. Kopple, *Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **45**(12): p. 2615-2623.

50. Wood, J.M., J. Maibaum, J. Rahuel, M.G. Grütter, N.-C. Cohen, V. Rasetti, H. Rüger, R. Göschke, S. Stutz, W. Fuhrer, W. Schilling, P. Rigollier, Y. Yamaguchi, F. Cumin, H.-P. Baum, C.R. Schnell, P. Herold, R. Mah, C. Jensen, E. O'Brien, A. Stanton, and M.P. Bedigian, *Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **308**(4): p. 698-705.
51. Rahuel, J., V. Rasetti, J. Maibaum, H. Rüeger, R. Göschke, N.C. Cohen, S. Stutz, F. Cumin, W. Fuhrer, J.M. Wood, and M.G. Grütter, *Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin*. Chemistry & Biology, 2000. **7**(7): p. 493-504.
52. Tait, B.D., S. Hagen, J. Domagala, E.L. Ellsworth, C. Gajda, H.W. Hamilton, J.V.N. Vara Prasad, D. Ferguson, N. Graham, D. Hupe, C. Nouhan, P.J. Tummino, C. Humblet, E.A. Lunney, A. Pavlovsky, J. Rubin, S.J. Gracheck, E.T. Baldwin, T.N. Bhat, J.W. Erickson, S.V. Gulnik, and B. Liu, *4-Hydroxy-5,6-dihydropyrones. 2. Potent Non-Peptide Inhibitors of HIV Protease*. Journal of Medicinal Chemistry, 1997. **40**(23): p. 3781-3792.
53. Turner, S.R., J.W. Strohbach, R.A. Tommasi, P.A. Aristoff, P.D. Johnson, H.I. Skulnick, L.A. Dolak, E.P. Seest, P.K. Tomich, M.J. Bohanon, M.-M. Horng, J.C. Lynn, K.-T. Chong, R.R. Hinshaw, K.D. Watenpaugh, M.N. Janakiraman, and S. Thaisrivongs, *Tipranavir (PNU-140690): A Potent, Orally Bioavailable Nonpeptidic HIV Protease Inhibitor of the 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrone Sulfonamide Class*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(18): p. 3467-3476.
54. Lam, P.Y., P.K. Jadhav, C.J. Eyermann, C.N. Hodge, Y. Ru, L.T. Bacheler, J.L. Meek, M.J. Otto, M.M. Rayner, Y.N. Wong, and a. et, *Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors*. Science, 1994. **263**(5145): p. 380-384.
55. Lam, P.Y.S., Y. Ru, P.K. Jadhav, P.E. Aldrich, G.V. DeLucca, C.J. Eyermann, C.-H. Chang, G. Emmett, E.R. Holler, W.F. Daneker, L. Li, P.N. Confalone, R.J. McHugh, Q. Han, R. Li, J.A. Markwalder, S.P. Seitz, T.R. Sharpe, L.T. Bacheler, M.M. Rayner, R.M. Klabe, L. Shum, D.L. Winslow, D.M. Kornhauser, D.A. Jackson, S. Erickson-Viitanen, and C.N. Hodge, *Cyclic HIV Protease Inhibitors: Synthesis, Conformational Analysis, P2/P2' Structure-Activity Relationship, and Molecular Recognition of Cyclic Ureas*. Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**(18): p. 3514-3525.
56. Güller, R., A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, G. Hirth, C. Jenny, M. Kansy, F. Montavon, M. Müller, C. Oefner, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, W. Wostl, and H.P. Märki, *Piperidine-renin inhibitors compounds with improved physicochemical properties*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999. **9**(10): p. 1403-1408.
57. Vieira, E., A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, R. Güller, G. Hirth, H.P. Märki, M. Müller, C. Oefner, M. Scalone, H. Stadler, M. Wihelm, and W. Wostl, *Substituted piperidines - highly potent renin inhibitors due to induced fit adaptation of the active site*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999. **9**(10): p. 1397-1402.
58. Oefner, C., A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, J.P. Clozel, A. D'Arcy, A. Dorn, W. Fischli, F. Grüniger, R. Güller, G. Hirth, H.P. Märki, S. Mathews, M. Müller, R.G. Ridley, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, F.K. Winkler, and W. Wostl, *Renin inhibition by substituted piperidines: A novel paradigm for the inhibition of monomeric aspartic proteinases?* Chemistry & Biology, 1999. **6**(3): p. 127-131.

59. Powell, N.A., E.H. Clay, D.D. Holsworth, J.W. Bryant, M.J. Ryan, M. Jalaie, E. Zhang, and J.J. Edmunds, *Equipotent activity in both enantiomers of a series of ketopiperazine-based renin inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005. **15**(9): p. 2371-2374.
60. Powell, N.A., E.H. Clay, D.D. Holsworth, J.W. Bryant, M.J. Ryan, M. Jalaie, and J.J. Edmunds, *Benzyl ether structure-activity relationships in a series of ketopiperazine-based renin inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005. **15**(21): p. 4713-4716.
61. Holsworth, D.D., M. Jalaie, T. Belliotti, C. Cai, W. Collard, S. Ferreira, N.A. Powell, M. Stier, E. Zhang, P. McConnell, I. Mochalkin, M.J. Ryan, J. Bryant, T. Li, A. Kasani, R. Subedi, S.N. Maiti, and J.J. Edmunds, *Discovery of 6-ethyl-2,4-diaminopyrimidine-based small molecule renin inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(13): p. 3575-3580.
62. Cole, D.C., E.S. Manas, J.R. Stock, J.S. Condon, L.D. Jennings, A. Aulabaugh, R. Chopra, R. Cowling, J.W. Ellingboe, K.Y. Fan, B.L. Harrison, Y. Hu, S. Jacobsen, G. Jin, L. Lin, F.E. Lovering, M.S. Malamas, M.L. Stahl, J. Strand, M.N. Sukhdeo, K. Svenson, M.J. Turner, E. Wagner, J. Wu, P. Zhou, and J. Bard, *Acylguanidines as Small-Molecule β -Secretase Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. **49**(21): p. 6158-6161.
63. Brass, S., N.-S. Chan, C. Gerlach, T. Luksch, J. Böttcher, and W.E. Diederich, *Synthesis of 2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepines as privileged ligand scaffolds for the design of aspartic protease inhibitors via a ring-closing metathesis approach*. Journal of Organometallic Chemistry, 2006. **691**(24-25): p. 5406-5422.
64. Böttcher, J., A. Blum, A. Heine, W.E. Diederich, and G. Klebe, *Structural and Kinetic Analysis of Pyrrolidine-Based Inhibitors of the Drug-Resistant Ile84Val Mutant of HIV-1 Protease*. Journal of Molecular Biology, 2008. **383**(2): p. 347-357.
65. Blum, A., Böttcher, J., Heine, A., Klebe, G., Diederich, W.E., *Structure-Guided Design of C2-Symmetric HIV-1 Protease Inhibitors Based on a Pyrrolidine Scaffold*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**: p. 2078-2087.
66. Rich, D.H., M.G. Bursavich, and M.A. Estiarte, *Discovery of nonpeptide, peptidomimetic peptidase inhibitors that target alternate enzyme active site conformations*. Peptide Science, 2002. **66**(2): p. 115-125.
67. Ghosh, A.K., *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*, ed. R. Mannhold, Kubinyi, H., Folkers, G. Vol. 45. 2010: WILEY-VCH.
68. *World Health Organization*. 2011.
69. Monini, P., C. Sgadari, E. Toschi, G. Barillari, and B. Ensoli, *Antitumour effects of antiretroviral therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 861-875.
70. Babine, R.E. and S.L. Bender, *Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design*. Chemical Reviews, 1997. **97**(5): p. 1359-1472.
71. Abdel-Meguid, S.S., *Inhibitors of Aspartyl Proteinases*. Medicinal Research Reviews, 1993. **13**(6): p. 731-778.
72. Amzel, L.M., *Structure-based drug design*. Current Opinion in Biotechnology, 1998. **9**(4): p. 366-369.

73. Webb, R.L., N. Schiering, R. Sedrani, and J.r. Maibaum, *Direct Renin Inhibitors as a New Therapy for Hypertension*. Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **53**(21): p. 7490-7520.
74. Edwards, P.D., J.S. Albert, M. Sylvester, D. Aharony, D. Andisik, O. Callaghan, J.B. Campbell, R.A. Carr, G. Chessari, M. Congreve, M. Frederickson, R.H.A. Folmer, S. Geschwindner, G. Koether, K. Kolmodin, J. Krumrine, R.C. Mauger, C.W. Murray, L.-L. Olsson, S. Patel, N. Spear, and G. Tian, *Application of Fragment-Based Lead Generation to the Discovery of Novel, Cyclic Amidine β -Secretase Inhibitors with Nanomolar Potency, Cellular Activity, and High Ligand Efficiency*. Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **50**(24): p. 5912-5925.
75. Geschwindner, S., L.-L. Olsson, J.S. Albert, J. Deinum, P.D. Edwards, T. de Beer, and R.H.A. Folmer, *Discovery of a Novel Warhead against β -Secretase through Fragment-Based Lead Generation*. Journal of Medicinal Chemistry, 2007. **50**(24): p. 5903-5911.
76. Coyne, A.G., D.E. Scott, and C. Abell, *Drugging challenging targets using fragment-based approaches*. Current Opinion in Chemical Biology, 2010. **14**(3): p. 299-307.
77. Holloway, M.K., P. Hunt, and G.B. McGaughey, *Structure and modeling in the design of β - and γ -secretase inhibitors*. Drug Development Research, 2009. **70**(2): p. 70-93.
78. Lunney, E.A., S.E. Hagen, J.M. Domagala, C. Humblet, J. Kosinski, B.D. Tait, J.S. Warmus, M. Wilson, and D. Ferguson, *A Novel Nonpeptide HIV-1 Protease Inhibitor: Elucidation of the Binding Mode and Its Application in the Design of Related Analogs*. Journal of Medicinal Chemistry, 1994. **37**(17): p. 2664-2677.
79. Blum, A., J. Böttcher, B. Sammet, T. Luksch, A. Heine, G. Klebe, and W.E. Diederich, *Achiral oligoamines as versatile tool for the development of aspartic protease inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008. **16**(18): p. 8574-8586.
80. Smith, R., I. Brereton, M., R. Chai, Y., and S.B. Kent, *Ionization states of the catalytic residues in HIV-1 protease*. Nature Structural Biology, 1996. **3**(11): p. 946-950.
81. Hyland, L.J., T.A. Tomaszek, and T.D. Meek, *Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism*. Biochemistry, 1991. **30**(34): p. 8454-8463.
82. Ido, E., H.P. Han, F.J. Kezdy, and J. Tang, *Kinetic studies of human immunodeficiency virus type 1 protease and its active-site hydrogen bond mutant A28S*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(36): p. 24359-66.
83. Trylska, J., J. Antosiewicz, M. Geller, C.N. Hodge, R.M. Klabe, M.S. Head, and M.K. Gilson, *Thermodynamic linkage between the binding of protons and inhibitors to HIV-1 protease*. Protein Science, 1999. **8**(1): p. 180-195.
84. Yamazaki, T., L.K. Nicholson, P. Wingfield, S.J. Stahl, J.D. Kaufman, C.J. Eyermann, C.N. Hodge, P.Y.S. Lam, and D.A. Torchia, *NMR and X-ray Evidence That the HIV Protease Catalytic Aspartyl Groups Are Protonated in the Complex Formed by the Protease and a Non-Peptide Cyclic Urea-Based Inhibitor*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(23): p. 10791-10792.

85. Czodrowski, P., C.A. Sotriffer, and G. Klebe, *Atypical Protonation States in the Active Site of HIV-1 Protease: A Computational Study*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2007. **47**(4): p. 1590-1598.
86. Spitzmüller, A., H.F.G. Velec, and G. Klebe, *MiniMuDS: A New Optimizer using Knowledge-Based Potentials Improves Scoring of Docking Solutions*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2011. **51**(6): p. 1423-1430.
87. Gohlke, H., M. Hendlich, and G. Klebe, *Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions*. Journal of Molecular Biology, 2000. **295**(2): p. 337-356.
88. Heine, H.W., W.G. Kenyon, and E.M. Johnson, *The Isomerization and Dimerization of Aziridine Derivatives. IV*. Journal of the American Chemical Society, 1961. **83**(11): p. 2570-2574.
89. Skerlj, R.T., S. Nan, Y. Zhou, and G.J. Bridger, *Facile synthesis of a selectively protected triazamacrocyclic*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**(42): p. 7569-7571.
90. Lowe, G., *Chiral peptide nucleic acids with a n-aminoethyl-d-proline backbone* U.S.P. Application, Editor. 2003.
91. INC.AMGEN, *Heterocyclic Modulators of PKB*, in *Espacenet*. 2009. p. 131-132.
92. Allen, C.F.H., F.W. Spangler, and E.R. Webster, *Ethylenimine*. Organic Syntheses, 1950. **30**: p. 38-40.
93. Krake, S.H. and S.C. Bergmeier, *Inter- and intramolecular reactions of epoxides and aziridines with π -nucleophiles*. Tetrahedron, 2010. **66**(37): p. 7337-7360.
94. Hudgson, D., Humphreys, Philip, Hughes, Steven, *Widening the usefulness of epoxides and aziridines in synthesis*. Pure and Applied Chemistry, 2007. **79**(2): p. 269-279.
95. Pineschi, M., *Asymmetric Ring-Opening of Epoxides and Aziridines with Carbon Nucleophiles*. European Journal of Organic Chemistry, 2006. **2006**(22): p. 4979-4988.
96. Padwa, A. and S. Murphree, *Epoxides and aziridines - A mini review*. ARKIVOC, 2006. **3**: p. 6-33.
97. Argouarch, G., G. Stones, C. Gibson, A. Kennedy, and D. Sherrington, *Bifurcated, modular syntheses of chiral annulet triazacyclononanes*. Org. Biomol.Chem, 2003. **1**: p. 4408-4417.
98. Katritzky, A.R., B. Pilarski, and L. Urogi, *Efficient Conversion of Nitriles to Amides with Basic Hydrogen Peroxide in Dimethyl Sulfoxide*. Synthesis, 1989. **1989**(12): p. 949,950.
99. Miyashita, M., A. Yoshikoshi, and P.A. Grieco, *Pyridinium p-toluenesulfonate. A mild and efficient catalyst for the tetrahydropyranylation of alcohols*. The Journal of Organic Chemistry, 1977. **42**(23): p. 3772-3774.
100. Benoist, E., A. Loussouarn, P. Remaud, J.-F.o. Chatal, and J.-F.o. Gustin, *Convenient and Simplified Approaches to N-Monoprotected Triaminopropane Derivatives: Key Intermediates for Bifunctional Chelating Agent Synthesis*. Synthesis, 1998. **1998**(08): p. 1113,1118.
101. Neri, C. and J.M.J. Williams, *New Routes to Chiral Evans Auxiliaries by Enzymatic Desymmetrisation and Resolution Strategies*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2003. **345**(6-7): p. 835-848.

102. Busto, E., V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, and V. Gotor, *Development of a chemoenzymatic strategy for the synthesis of optically active and orthogonally protected polyamines*. Tetrahedron, 2009. **65**(40): p. 8393-8401.
103. Amundsen, L.H. and L.S. Nelson, *Reduction of Nitriles to Primary Amines with Lithium Aluminum Hydride*. Journal of the American Chemical Society, 1951. **73**(1): p. 242-244.
104. Chandler, B.D., J.T. Roland, Y. Li, and E.J. Sorensen, *Seebach's Conjunctive Reagent Enables Double Cyclizations*. Organic Letters, 2010. **12**(12): p. 2746-2749.
105. Greene, T.W. and P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*. 3rd ed. 1999: JOHN WILEY & SONS, INC.
106. Kurtz, P., H. Schwarz, and H. Disselnkötter, *Über 1-Cyan-alkene-(2) IV. Mitteilung über die Bildung von Nitrilen*. Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1960. **631**(1): p. 21-56.
107. Mikata, Y., Y. Inaba, M. Morioka, and S. Yano, *General synthesis of sugar-pendant 1,3-propanediamines containing a C-glycoside linkage*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**(48): p. 8785-8788.
108. Hamilton, D.J. and A. Sutherland, *A flexible approach for the synthesis of selectively labelled l-arginine*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**(29): p. 5739-5741.
109. Secrist, J.A. and M.W. Logue, *Amine hydrochlorides by reduction in the presence of chloroform*. The Journal of Organic Chemistry, 1972. **37**(2): p. 335-336.
110. Bräse, S., C. Gil, K. Knepper, and V. Zimmermann, *Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds*. Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(33): p. 5188-5240.
111. Bose, A.K., J.F. Kistner, and L. Farber, *A Convenient Synthesis of Axial Amines*. The Journal of Organic Chemistry, 1962. **27**(8): p. 2925-2927.
112. Chooi, S.Y.M., P.-h. Leung, S.-c. Ng, G.H. Quek, and K.Y. Sim, *A simple route to optically pure 2,3-diaminobutane*. Tetrahedron: Asymmetry, 1991. **2**(10): p. 981-982.
113. Fabiano, E., B.T. Golding, and M.M. Sadeghi, *A Simple Conversion of Alcohols into Amines*. Synthesis, 1987. **1987**(02): p. 190,192.
114. Hoth, W. and G. Pyl, *Über die Darstellung der Stickstoffwasserstoffsäure und ihrer Salze*. Angewandte Chemie, 1929. **42**(36): p. 888-891.
115. Cremlyn, R.J.W., *Some reactions of O,O-diphenylphosphoryl azide*. Australian Journal of Chemistry, 1973. **26**(7): p. 1591-1593.
116. Lal, B., B.N. Pramanik, M.S. Manhas, and A.K. Bose, *Diphenylphosphoryl azide a novel reagent for the stereospecific synthesis of azides from alcohols*. Tetrahedron Letters, 1977. **18**(23): p. 1977-1980.
117. Haefliger, W. and E. Klöppner, *Stereospezifische Synthese einer neuen Morphin-Teilstruktur*. Helvetica Chimica Acta, 1982. **65**(6): p. 1837-1852.
118. Staudinger, H. and J. Meyer, *Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine*. Helvetica Chimica Acta, 1919. **2**(1): p. 635-646.
119. Gololobov, Y.G., I.N. Zhmurova, and L.F. Kasukhin, *Sixty years of staudinger reaction*. Tetrahedron, 1981. **37**(3): p. 437-472.
120. Ala, P.J., R.J. DeLoskey, E.E. Huston, P.K. Jadhav, P.Y.S. Lam, C.J. Eyermann, C.N. Hodge, M.C. Schadt, F.A. Lewandowski, P.C. Weber, D.D.

- McCabe, J.L. Duke, and C.-H. Chang, *Molecular Recognition of Cyclic Urea HIV-1 Protease Inhibitors*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(20): p. 12325-12331.
121. Pierce, M.E., G.D. Harris, Q. Islam, L.A. Radesca, L. Storace, R.E. Waltermire, E. Wat, P.K. Jadhav, and G.C. Emmett, *Stereoselective Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitor, DMP 323*. The Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(2): p. 444-450.
122. McGovern, S.L., E. Caselli, N. Grigorieff, and B.K. Shoichet, *A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening*. Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **45**(8): p. 1712-1722.
123. Feng, B.Y., A. Shelat, T.N. Doman, R.K. Guy, and B.K. Shoichet, *High-throughput assays for promiscuous inhibitors*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(3): p. 146-148.
124. McGovern, S.L., B.T. Helfand, B. Feng, and B.K. Shoichet, *A Specific Mechanism of Nonspecific Inhibition*. Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **46**(20): p. 4265-4272.
125. Ryan, A.J., N.M. Gray, P.N. Lowe, and C.-w. Chung, *Effect of Detergent on "Promiscuous" Inhibitors*. Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **46**(16): p. 3448-3451.
126. Ezgimen, M.D., N.H. Mueller, T. Teramoto, and R. Padmanabhan, *Effects of detergents on the West Nile virus protease activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**(9): p. 3278-3282.
127. Bauer, J., S. Spanton, R. Henry, J. Quick, W. Dziki, W. Porter, and J. Morris, *Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism*. Pharmaceutical Research, 2001. **18**(6): p. 859-866.
128. Roth, K., *Polymorphie: Fast ein kristallographisches Wintermärchen*. Chemie in unserer Zeit, 2006. **40**(6): p. 398-406.
129. Hopkins, A.L., C.R. Groom, and A. Alex, *Ligand efficiency: a useful metric for lead selection*. Drug Discovery Today, 2004. **9**(10): p. 430-431.
130. Kuntz, I.D., K. Chen, K.A. Sharp, and P.A. Kollaman, *The maximal affinity of ligands*. PNAS, 1999. **96**: p. 9997-10002.
131. Bembenek, S.D., B.A. Tounge, and C.H. Reynolds, *Ligand efficiency and fragment-based drug discovery*. Drug Discovery Today, 2009. **14**(5-6): p. 278-283.
132. Reynolds, C.H., B.A. Tounge, and S.D. Bembenek, *Ligand Binding Efficiency: Trends, Physical Basis, and Implications*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(8): p. 2432-2438.
133. Enders, D. and L. Wortmann, *Asymmetric Synthesis of 4,6-Disubstituted 1,2,3,4,5,6-Hexahydro-5-hydroxypyrimidin-2-ones as Potential HIV-Protease-Inhibitors*. Heterocycles, 2002. **58**(1): p. 293-299.
134. Job, A., C.F. Janeck, W. Bettray, R. Peters, and D. Enders, *The SAMP-/RAMP-hydrazone methodology in asymmetric synthesis*. Tetrahedron, 2002. **58**(12): p. 2253-2329.
135. Enders, D. and H. Schubert, *Enantioselektive Synthese von β -substituierten primären Aminen; α -Alkylierung/reduktive Aminierung von Aldehyden via SAMP-Hydrazone*. Angewandte Chemie, 1984. **96**(5): p. 368-369.
136. Enders, D. and H. Schubert, *Enantioselective Synthesis of β -Substituted Primary Amines; α -Alkylation/Reductive Amination of Aldehydes via SAMP-*

- Hydrazones*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1984. **23**(5): p. 365-366.
137. Nagel, U., *Asymmetric Hydrogenation of α -(Acetylamino)cinnamic Acid with a Novel Rhodium Complex; the Design of an Optimal Ligand*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1984. **23**(6): p. 435-436.
138. Nagel, U., E. Kinzel, J. Andrade, and G. Prescher, *Enantioselektive Katalyse, 4. Synthese N-substituierter (R,R)-3,4-Bis(diphenylphosphino)-pyrrolidine und Anwendung ihrer Rhodiumkomplexe zur asymmetrischen Hydrierung von α -(Acylamino)acrylsäure-Derivaten*. Chemische Berichte, 1986. **119**(11): p. 3326-3343.
139. Teramoto, T., M. Deguchi, T. Kurosaki, and M. Okawara, *Optically active N-hydroxytartrimes for enantioselective peptide synthesis*. Tetrahedron Letters, 1981. **22**(12): p. 1109-1112.
140. Procopio, A., S. Alcaro, A. De Nino, L. Maiuolo, F. Ortuso, and G. Sindona, *New conformationally locked bicyclic N,O-nucleoside analogues of antiviral drugs*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005. **15**(3): p. 545-550.
141. Corminboeuf, O., O. Bezencon, C. Grisostomi, L.u. Remen, S. Richard-Bildstein, D. Bur, L. Prade, P. Hess, P. Strickner, W. Fischli, B. Steiner, and A. Treiber, *Design and optimization of new piperidines as renin inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**(21): p. 6286-6290.
142. Böttcher, J., A. Blum, S. Dörr, A. Heine, W.E. Diederich, and G. Klebe, *Targeting the Open-Flap Conformation of HIV-1 Protease with Pyrrolidine-Based Inhibitors*. ChemMedChem, 2008. **3**(9): p. 1337-1344.
143. Cossy, J., C. Dumas, P. Michel, and D.G. Pardo, *Formation of optically active 3-hydroxypiperidines*. Tetrahedron Letters, 1995. **36**(4): p. 549-552.
144. Cossy, J., C. Dumas, and D.G. Pardo, *Ring Expansion – Formation of Optically Active 3-Hydroxypiperidines from Pyrrolidinemethanol Derivatives*. European Journal of Organic Chemistry, 1999. **1999**(7): p. 1693-1699.
145. Roudeau, R., D. Gomez Pardo, and J. Cossy, *Enantioselective diethylzinc addition to aromatic and aliphatic aldehydes using (3R,5R)-dihydroxypiperidine derivatives catalyst*. Tetrahedron, 2006. **62**(10): p. 2388-2394.
146. Kovacková, S., M. Dracínský, and D. Rejman, *The synthesis of piperidine nucleoside analogs - a comparison of several methods to access the introduction of nucleobases*. Tetrahedron, 2011. **67**(7): p. 1485-1500.
147. Reynolds, C.H., S.D. Bembenek, and B.A. Tounge, *The role of molecular size in ligand efficiency*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(15): p. 4258-4261.
148. Williams, D.B.G. and M. Lawton, *Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants*. The Journal of Organic Chemistry, 2010. **75**(24): p. 8351-8354.
149. Toth, M.V. and G.R. Marshall, *A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease*. International Journal of Peptide and Protein Research, 1990. **36**(6): p. 544-550.
150. Adams, L.A., V.K. Aggarwal, R.V. Bonnert, B. Bressel, R.J. Cox, J. Shepherd, J. de Vicente, M. Walter, W.G. Whittingham, and C.L. Winn, *Diastereoselective Synthesis of Cyclopropane Amino Acids Using Diazo*

- Compounds Generated in Situ*. The Journal of Organic Chemistry, 2003. **68**(24): p. 9433-9440.
151. Pickering, L., B.S. Malhi, P.L. Coe, and R.T. Walker, *4'-Methyloxycarbamyl-3'-deoxy-5-methyluridine; synthesis of a novel nucleoside analogue*. Tetrahedron, 1995. **51**(9): p. 2719-2728.

8 ANHANG

8.1 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

*„Design und Synthese neuartiger Grundstrukturen zur Inhibition von
Aspartat-Proteasen der Familien A1 und A2“*

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 6. Januar 2012

Kerstin Linde

8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, mit denen ich während der Zeit in Marburg zusammen gearbeitet habe:

An erster Stelle danke ich meiner „Doktor-Mutter“ *Prof. Dr. Wibke E. Diederich* für die interessante Aufgabenstellung sowie die hervorragende Betreuung und Unterstützung über den gesamten Zeitraum des Entstehens dieser Arbeit. Ihre Diskussionsbereitschaft und ihre kreativen Denkansätze bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse haben die Arbeit immer weiter vorangebracht.

Herrn *Prof. Dr. Gerhard Klebe* danke ich für Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Möglichkeit zur Nutzung seines S1-Labors und der Software, die für die durchgeführten Dockingexperimente benötigt wurden.

Dem gesamten AK Diederich, *Nina Klee*, *Philipp Toth*, *Frithjof Scheer*, *Maren Kuhnert*, *Michael Schäfer* und *Steffi Dörr*, danke für den freundschaftlichen Umgang sowohl innerhalb als auch außerhalb des Instituts. Diese großartige Atmosphäre hat dazu beigetragen, dass ich jeden Arbeitstag mit viel Freude und Motivation in Angriff nehmen konnte.

Ganz besonders möchte ich mich bei *Nina Klee* bedanken, für die Investition von viel Zeit und Mühe in die Kristallisationsversuche der Hydroxylamine und das Vermessen einiger meiner Verbindungen im HIV-Assay.

Steffi Dörr danke ich für die Ausarbeitung des neuen Arbeitsprotokolls für die Expression der HIV-Protease, der Unterstützung bei den Assay-Messungen und die exzellente Ausführung von Synthesaufträgen.

Bei *Nan-Si* und *Sascha Brass* bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme im AK Diederich zu Beginn der Promotionszeit.

Den ehemaligen Auszubildenden *Zeynel Can* und *Thomas Kronenberger* danke ich für die Hilfe im Labor während ihrer Ausbildungszeit. Wobei *Thomas* ein besonderer Dank gebührt, da er zu einem späteren Zeitpunkt als Hiwi bei uns im Arbeitskreis tolle Arbeit bei der Synthese der Piperidin-Diester geleistet hat.

Hans-Dieter Gerber danke ich für die Hilfe bei synthetischen Problemen, bei denen er immer durch seinen großen Erfahrungsschatz wertvolle Anregungen geben konnte.

Ich bedanke mich bei meinen Vertiefungsstudenten *Manuel Kanitz* und *Patrick Mäder* für ihre Mitarbeit, die durch hohe Motivation und Eigeninitiative zum Voranbringen der einzelnen Teilprojekte beigetragen haben.

Lydia Hartleben danke ich für die sorgfältige und unkomplizierte Ausführung der Chemikalienbestellungen und die Hilfe bei administrativen Fragestellungen.

Bei *Tobias Craan* und *Andreas Spitzmüller* möchte ich mich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in das computergestützte Wirkstoffdesign bedanken.

Sven Siebler, *Gerd Neudert* und *Michael Betz* möchte ich für die Netzwerkadministration und die schnelle Hilfe bei Software-Problemen danken.

Ahyoung Park, *Barbara Wienen* und *Martin Stieler* danke ich für etliche Kristallisationsversuche sowohl mit der HIV-Protease als auch mit Endothiapepsin.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der analytischen Abteilungen und allen weiteren Service-Abteilungen des Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Für seine uneingeschränkte Unterstützung und seinen unermüdlichen Zuspruch während der gesamten Zeit in Marburg möchte ich mich bei meinem Freund *Jörn* bedanken. Besonders die geduldigen Korrekturen von Grammatik-, Rechtschreib- und Formfehler und seine unerschütterliche Ruhe in der Zeit der Erstellung dieses Dokuments hat mir vieles erleichtert.

Zu guter Letzt danke ich *meinen Eltern*, die mir durch ihre bedingungslose Unterstützung das Studium, diese Arbeit und glücklicherweise auch die Mitnahme meines Pferdes Jack nach Marburg ermöglicht haben.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Linde
Geburtsdatum: 25.12.1981
Geburtsort: Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische und schulische Ausbildung

Seit 04. 2008	Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg Promotionsarbeit: „Design und Synthese neuartiger Grundstrukturen zur Inhibition von Aspartat-Proteasen der Familien A1 und A2“, betreut von Frau Prof. Dr. Wibke E. Diederich
02. 2007 – 08. 2007	Institut für Pharmakologie und Institut für Organische Chemie, Universität zu Köln Diplomarbeit: „Synthese von Cyclo(Arginin-Prolin) und Cyclo(Lysin-Prolin) und die Bestimmung deren Transporteffizienzen mit den humanen organischen Kationentransportern OCT1, OCT2 und EMT“
10. 2001 – 08. 2007	RWTH Aachen und Universität zu Köln Studium der Chemie, Abschluss als Diplom-Chemikerin
08. 1992 – 07. 2001	Engelbert vom Berg-Gymnasium, Wipperfürth

Praktika und Lehrtätigkeit

Seit 04. 2008	Philipps-Universität Marburg Betreuung des Praktikums: „Chemie der organischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“ im 3. Fachsemester des Pharmaziestudiums
09. 2007 – 12. 2007	Bayer Health Care AG, Wuppertal, Bereich Lead Generation & Optimization

Sonstiges _____**Tagungen und Poster**

03. 2011 **Universität des Saarlandes**, Frontiers in Medicinal Chemistry
03. 2010 **Universität Münster**, Frontiers in Medicinal Chemistry,
Poster: „New Inhibitors for an Old Target: Piperidines and Pyrrolidines to Block HIV-Protease”, Klee, N.*, Linde, K.*, Lindemann, I., Klebe, G., Diederich, W. E.
10. 2009 **Universität Würzburg**, 2. Internationales Symposium „Novel Agents against Infectious Diseases – An Interdisciplinary Approach“
10. 2008 **Universität Regensburg**, 4th Summer School Medicinal Chemistry: „Molecular Recognition - Ligand Receptor Interactions”

Publikationen:

Linde, K.*, Klee, N.*, Klebe, G., Diederich, W. E.; „A convenient one-pot procedure for the conversion of *bis*-alcohols into *bis*-amines“; eingereicht